

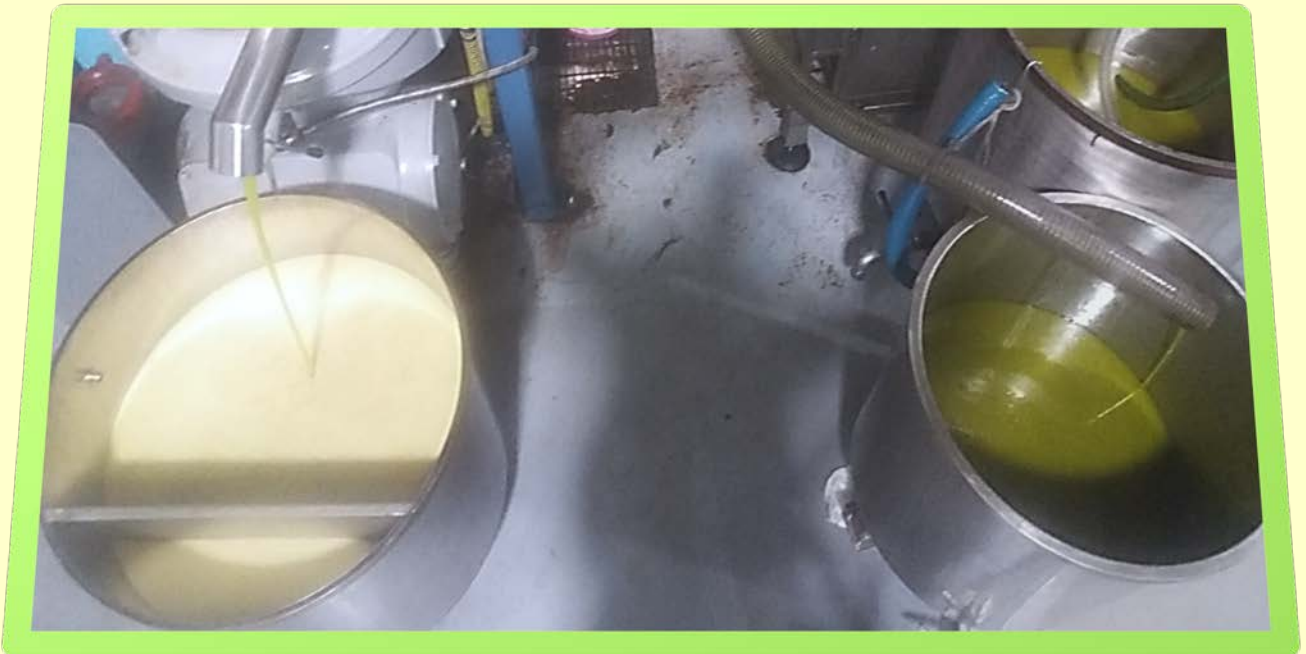
# Il Progetto IT4NUEVOO

Impianti e tecnologie innovative per l'estrazione di un nuovo olio extravergine  
d'oliva nutraceutico e con elevato contenuto di sostanze salutari

*Progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali,  
nell'ambito del settore olivicolo-oleario ai sensi del D.M. n. 30311 del 31/10/2018*

a cura di

Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo



---

# Il Progetto IT4NUEVOO

## The IT4NUEVOO Project

---

Impianti e tecnologie innovative per l'estrazione di un nuovo olio extravergine d'oliva nutraceutico e con elevato contenuto di sostanze salutari

*Progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, nell'ambito del settore olivicolo-oleario ai sensi del D.M. n. 30311, 31/10/2018*

---

Innovative plants and technologies for the extraction of a new nutraceutical extra virgin olive oil with a high content of healthy substances

*Research project funded by the Ministry of Agricultural, Food and Forestry Policies, in the olive-oil area according to Ministerial Decree no. 30311, 31/10/2018*

---

a cura di

Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo



Il Progetto IT4NUEVOO : impianti e tecnologie innovative per l'estrazione di un nuovo olio extravergine d'oliva nutraceutico e con elevato contenuto di sostanze salutari : progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, nell'ambito del settore olivicolo-oleario ai sensi del D.M. n. 30311, 31/10/2018 = The IT4NUEVOO Project : Innovative plants and technologies for the extraction of a new nutraceutical extra virgin olive oil with a high content of healthy substances Research : project funded by the Ministry of Agricultural, Food and Forestry Policies, in the olive-oil area according to Ministerial Decree no. 30311, 31/10/2018 / a cura di Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo. – Potenza : BUP - Basilicata University Press, 2022. – X, 200 p. ; 30 cm.

ISBN: 978-88-31309-18-9

Progetto di ricerca finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, nell'ambito del settore olivicolo-oleario ai sensi del D.M. n. 30311 del 31/10/2018

*Direzione scientifica*

Giuseppe Altieri (Univ. Basilicata); Francesco Genovese (Univ. Basilicata); Attilio Matera (Univ. Basilicata); Giovanni Carlo Di Renzo (Univ. Basilicata).

Università degli Studi della Basilicata, Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali - SAFE

SITO WEB del Progetto IT4NUEVOO: <https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/>



Tutti i testi pubblicati sono stati rivisti, secondo le modalità del “doppio cieco” (*double blind peer review*), da non meno di due revisori specialisti nel campo.

© 2022 BUP - Basilicata University Press

Università degli Studi della Basilicata

Biblioteca Centrale di Ateneo

Via Nazario Sauro 85

I - 85100 Potenza

<https://bup.unibas.it>

Published in Italy

Prima edizione: novembre 2022

Gli E-Book della BUP sono pubblicati con licenza

Creative Commons Attribution 4.0 International

**In copertina:** separazione finale dell'olio extravergine di oliva, a sinistra con centrifuga tradizionale, a destra con centrifuga innovativa (*final separation of extra virgin olive oil, on the left with traditional centrifuge, on the right with innovative centrifuge*). Foto cortesia di G.C. Di Renzo.

## **Obiettivo del Progetto**

Il progetto IT4NUEVOO ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione del processo di estrazione al fine di migliorare le rese di estrazione della materia grassa e delle sostanze antiossidanti presenti nelle drupe. La ricerca industriale e lo sviluppo sperimentale del progetto sono stati finalizzati allo sviluppo di un nuovo prodotto alimentare denominato NUEVOO e alla messa a punto di un protocollo di produzione che integri il ciclo produttivo con nuove macchine per migliorare l'estrazione dei composti polifenolici.

## **Motivazioni del Progetto**

Ogni produttore di olio extravergine di oliva (EVOO) è consapevole che la qualità dell'olio prodotto ha un ruolo chiave nella strategia per incoraggiare nuove occasioni di consumo e affrontare le sfide di un mercato globale. Tuttavia allo stato attuale in tutti i Paesi produttori è sensibilmente più alta la quantità di olio vergine di oliva (VOO) di scarsa qualità piuttosto che di EVOO. Dall'analisi di contesto è evidente che la dimensione aziendale degli oleifici (micro e piccola PMI) rende molto difficile o impossibile l'investimento nella ricerca per sviluppare tecnologie, protocolli di estrazione o nuovi prodotti. Gli oleifici funzionano solo per 1-2 mesi/anno, quindi non possono permettersi i costi di ricerca e sviluppo di nuove tecnologie personalizzate in base alle specifiche esigenze industriali e molto distanti dalla ricerca svolta in laboratorio. Dall'altra parte, il consumatore richiede un prodotto di alta qualità e con caratteristiche salutistiche e possibilmente nutraceutiche.

Per questo motivo diversi studi e progetti sono stati realizzati per sviluppare e verificare come la singola operazione e il parametro e/o tecnologia di processo influenzano il tasso di estrazione dell'olio e, in alcuni casi, la qualità dell'olio di oliva non è sufficiente. Infatti, tutti i risultati riportati sono influenzati dall'elevata variabilità, come molti Autori riportano, a causa di molti fattori esterni. Pertanto, il legame intercorrente fra le singole operazioni tecnologiche / parametri con la qualità e le proprietà salutari risultano, fino ad ora, labili e non ben definiti a causa di fattori incontrollati.

## **Benefici ottenibili dal Progetto**

- ottimizzazione del processo di estrazione esistente con uno sviluppo tecnologico gestibile e sostenibile;
- sviluppo di una nuova tipologia di olio extravergine di oliva (NUEVOO) con proprietà nutraceutiche e salutari (cioè un contenuto antiossidante potenziato) e un gusto sensoriale molto alto;
- sviluppo di uno specifico protocollo di estrazione (EP) che potrebbe diventare il riferimento per la moltitudine di frantoi (OM) micro, piccoli e medi;
- rafforzamento dell'immagine dell'EVOO come prodotto salutare e aumento dei consumi;
- sviluppo di nuove modifiche/macchine in grado di valorizzare le caratteristiche dell'olio prodotto (nuova gramola, nuovo approccio tecnologico, nuovo sistema di separazione);
- sviluppo di un protocollo di trattamento microbiologico dell'olio per aumentarne le caratteristiche nutrizionali;
- sviluppo di nuovi prodotti come salse/condimenti a base di NUEVOO

## **Aim of the Project**

The IT4NUEVOO project aimed to optimise the extraction process in order to improve the extraction yields of fat and antioxidant substances present in the olive drupes. The industrial research and experimental development of the project were aimed to the development of a new food product called NUEVOO and of a new production protocol integrating the production cycle with new machines to improve the extraction of polyphenolic compounds.

## **Motivation of the Project**

Every producer of extra virgin olive oil (EVOO) is aware that the quality of the oil produced plays a key role in the strategy to encourage new consumption opportunities and face the challenges of a global market. But, at present in all producing countries the quantity of poor-quality virgin olive oil (VOO) is significantly higher than EVOO. From this context it is evident that the company size of the oil mills (micro and small SMEs) makes it very difficult or impossible to invest in research to develop technologies, extraction protocols or new products. Oil mills only work for 1-2 months / year, so they cannot afford the costs of research and development of new technologies customized according to specific industrial needs and very far from the research carried out in the laboratory. On the other hand, the consumer requires a high-quality product with health and possibly nutraceutical characteristics.

For this reason, several studies and projects have been carried out to develop and verify how the single operation and/or process technology affect the oil extraction yield and the quality of the olive oil. In fact, all reported results are influenced by high variability due to several external factors. Therefore, the link between the individual technological operation with quality and health properties are, until now, not well defined due to uncontrolled factors.

## **Benefits achievable by means of the Project**

- optimization of the existing extraction process with manageable and sustainable technological development;
- development of a new type of extra virgin olive oil (NUEVOO) with nutraceutical and healthy properties (i.e. an enhanced antioxidant content) and a very high sensory taste;
- development of a specific extraction protocol (EP) that could become the reference for a multitude of micro, small and medium mills (OM);
- strengthening the image of EVOO as a healthy product and increasing consumption;
- development of new modifications/machines able to enhance the characteristics of the oil produced (new kneading machine, new technological approach, new separation system);
- development of a microbiological treatment protocol of the oil to increase its nutritional characteristics;
- development of new products such as NUEVOO-based sauces/condiments

## Giuseppe ALTIERI

( <https://orcid.org/0000-0002-2110-0751> )

G. Altieri è professore associato presso la Scuola SAFE – Scuola di Scienze Forestali Agrarie Alimentari e Ambientali – Università della Basilicata – Potenza – Italia, attualmente docente di "Automazione e Controllo dei Processi dell'Industria Agroalimentare" e di "Ingegneria alimentare: principi di macchine e impianti per l'industria agroalimentare". Responsabilità: dal 2021, Rappresentante della Scuola SAFE nel Comitato Direttivo del "Centro Infrastrutturale Sistemi ICT" (CISIT) dell'Università della Basilicata; dal 2018, Coordinatore dei Corsi in Tecnologie Alimentari e Scienze e Tecnologie Alimentari della Scuola SAFE; dal 2018, Responsabile della gestione del "CISIA On-line Test" per la Scuola SAFE; dal 2016, Responsabile della gestione del sito web e dei sistemi informativi della Scuola SAFE; dal 2013, Membro della Commissione di Assicurazione della Qualità dei Corsi in Tecnologie Alimentari e Scienze e Tecnologie Alimentari presso la Scuola SAFE. Dal 2012, Fondatore dello Spin-Off Accademico, "Ninetek – Innovazioni per l'Agro-Industria", responsabile della gestione R&D (<https://nineteksr.wordpress.com/>). Dal 2000, Membro del Collegio di Dottorato della Scuola SAFE (Agricultural, Forest, and Food Sciences).

G. Altieri è uno specialista nella progettazione e messa a punto di sistemi di controllo on-line per lo stoccaggio, il raffreddamento e il congelamento di prodotti agro-alimentari e nell'utilizzo dell'analisi statistica multilinare su dati spettrofotometrici per ottimizzare e controllare i processi agroalimentari. L'attività di ricerca, sviluppata nei principali settori relativi alla Meccanica Agraria, è focalizzata principalmente sulla modellazione, il controllo e l'automazione dei processi produttivi agro-industriali e delle macchine agricole, con l'obiettivo di ottimizzare sia la gestione della produzione che il fabbisogno energetico; ciò è stato ottenuto attraverso lo sviluppo di nuove tecnologie e nuovi sensori per il controllo di processo on-line relativo agli impianti agroindustriali. Brevetti: 1) BLOW, un congegno brevettato per il controllo dell'atmosfera modificata nel confezionamento di frutti e vegetali (per dettagli PCT/IB2016/0506600); 2) ROTASED, una macchina brevettata per la separazione finale dell'olio di oliva (per dettagli IT201600078140). Inoltre, G. Altieri è membro delle seguenti società: 1) AIIA (Italian Society of Agricultural Engineering); 2) EurAgEng (European Society for Agricultural Engineers); 3) CIGR (International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering).

G. Altieri is an associate research professor at the Dept. SAFE – School of Agricultural Forest Food and Environmental Sciences – Basilicata University – Potenza – Italy, currently lecturing in "Automation and Control of the Agri-food Industry Processes" and in "Food engineering: principles of machines and plants for the agri-food industry". From 2021, Member representative of SAFE School at Steering Committee of Infrastructural and ICT Systems Center (aka CISIT) of University of Basilicata. From 2018, Coordinator of Courses in Food Technologies (Bachelor) and Food Sciences and Technologies (Master) at the SAFE School. From 2018, SAFE School Head Management and responsible for CISIA On-line Test. From 2016, Head Management of the SAFE School Website & Information System. From 2013, Member of the Educational Quality Assessment & Assurance Committee in the Courses of Food Technologies and Food Sciences and Technologies. From 2012, Academic Spin-Off Founder, "Ninetek - Innovations for Agri-Industry", R&D branch responsible (R&D Manager) (<https://nineteksr.wordpress.com/>). From 2000, Member of the PhD College at the SAFE School (Agricultural, Forest, and Food Sciences).

G. Altieri is a specialist in design and setup of on-line control systems for the storage, cooling and freezing of agricultural foodstuffs and in the use of spectra multilinear statistical analysis to optimize and control the agri-food processes. The research activity, developed in the main fields related to Agricultural Mechanics, it is mainly focused on the modelling, control and automation of the agro-industrial production processes and agricultural machineries, with the aim to optimize and manage of both production and energy requirements; this is accomplished through the development of new technologies and new sensors for the on-line process control related to agri-industry plants. Patents: 1) BLOW, a patented device to control Modified Atmosphere Packaging of fruit and vegetables (see details at PCT/IB2016/0506600); 2) ROTASED, a patented device acting as olive oil final separator (see details at IT201600078140). Furthermore, G. Altieri is member of: 1) AIIA (Italian Society of Agricultural Engineering); 2) EurAgEng (European Society for Agricultural Engineers); 3) CIGR (International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering).

## Francesco GENOVESE

( <https://orcid.org/0000-0002-9326-1183> )

F. Genovese è Professore Associato con decorrenza Ottobre 2022 (già Ricercatore con anzianità 2011), presso la Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE) dell'Università degli Studi della Basilicata. Laureato in Scienze e Tecnologie Alimentari, è Dottore di Ricerca in "ECONOMIA E INGEGNERIA AGRO-ALIMENTARI AMBIENTALI E FORESTALI". È titolare dell'insegnamento di "Laboratorio di macchine e impianti per le produzioni lattiero casearie", insegnamento a scelta nel CdL in Scienze e Tecnologie Alimentari LM70. - è responsabile scientifico del progetto "Sharing Knowledge to increase Post-harvest Efficiency (SKIPE)" approvato con DGR 793 del 09/11/2020 nell'ambito del POR FESR Basilicata 2014-2020 Avviso Pubblico per la selezione di progetti di cooperazione interregionale e transnazionale (ai sensi dell'art. 96.3.d del Reg. (UE) n. 1303/2013), di durata 24 mesi;- è responsabile dell'unità operativa di Macchine e Impianti per le industrie alimentari, nell'ambito del progetto PSR Basilicata 2014-2020 Bando Misura 16 Sottomisura 16.2 - "Sostegno a progetti pilota e allo sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie - Diversificazione della produzione dei formaggi lucani e loro caratteristiche funzionali. Progetto: Formaggi lucani PLUS (durata 24 mesi; avvio delle attività GENNAIO 2020); - ha coordinato le attività tecnico scientifiche dello spin off "Ninetek innovazioni per l'Agro-industria srl" nell'ambito del progetto europeo Horizon 2020 denominato MYPACK - "Best markets for the exploitation of innovative sustainable food packaging solutions", un progetto di 42 mesi che ha avuto inizio il 1 novembre 2017 (Grant Agreement Number 774265). -ricercatore per il S.S.D. AGR/09 dal 20 dicembre 2011.

F. Genovese is Associate Professor since October 2022 (he was Professor Assistant at the School of Agriculture, Forest, Food And Environmental Sciences (SAFE) of the University of Basilicata, from December 2011). Graduated in Food Science and Technology, Ph. Doctor, is an expert on the following subject: Machines and plants for dairy processing, Machines and plants for wine industry, Machines and plants for food industry and Automation and Process Control in food industry (Scientific Discipline Sector AGR/09).

The scientific activity of F. Genovese has involved several issues regarding the SSD AGR / 09 (Agriculture Engineering) mainly aimed at creating models, control and automation of food processing, in order to increase food quality, optimize the production and energy management, through the development of new techniques and innovative sensors. Prof. Genovese also carried out research activity on the development of plants for dairy production with reference to milk thermal treatment, the stretching and shaping operations of "pasta filata" cheese, the recovery of the by-products of the dairy industry using low pressure evaporation techniques, ultrafiltration, reverse osmosis. He is the scientific responsible for the following projects: "Sharing Knowledge to increase Post-harvest Efficiency (SKIPE)" approved by DGR 793 of 09/11/2020 under the POR FESR Basilicata 2014-2020 Public Notice for the selection of interregional and transnational cooperation projects (according to art. 96.3.d of Reg. (EU) n. 1303/2013), lasting 24 months; WP leader in the Research Project of the Basilicata Regione (PSR 2014-2020) Measure 16 Submeasure 16.2 - "Support for pilot projects and development of new products, practices, processes and technologies - Diversification of the production of Lucanian cheeses and their functional characteristics. Project name: Formaggi lucani PLUS (duration 24 months; start of activities JANUARY 2020).-Coordinator of technical and scientific activities of the spin-off "Ninetek innovations for Agri-industry srl" in the context of the European project Horizon 2020 called MYPACK - "Best markets for the exploitation of innovative sustainable food packaging solutions", a 42-month project that began on November 1, 2017 (Grant Agreement Number 774265).

## Attilio MATERA

( <https://orcid.org/0000-0003-4372-1564> )

A. Matera è ricercatore accademico in Meccanica Agraria, nel settore di Ingegneria Agraria, Forestale e dei Biosistemi (07/C1), e titolare del corso di Machines and plants for fresh and fresh-cut products per il percorso in Inglese della laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari (LM70) presso l'Università degli Studi della Basilicata. Nel 2020 ha conseguito il dottorato di ricerca in Meccanica Agraria (AGR/09) sullo sviluppo e ottimizzazione di un sistema di confezionamento traspirante per prodotti ortofrutticoli freschi (I e IV gamma), basato su una valvola con proprietà selettive alla permeabilità dei gas. Nel 2018 ha guidato il team di ricerca dell'IROST di Teheran (IRAN) nella messa a punto e svolgimento delle attività sperimentali per l'ottimizzazione della conservabilità delle fragole e funghi di I gamma. È stato relatore in diverse conferenze e seminari, in ambito nazionale ed internazionale, nell'ambito dell'Ingegneria Agraria, Alimentare e dei Biosistemi, sviluppando ricerche e lavori indicizzati nell'ambito dello sviluppo di macchine e prototipi per il miglioramento della qualità e sicurezza igienica degli alimenti.

Ha condotto numerose esperienze nell'ambito del controllo analitico e valutazione delle proprietà fisico-meccaniche, microbiologiche, chimiche e spettrofotometriche degli alimenti, valutando l'effetto dei trattamenti termici a microonde e a conduzione sugli alimenti.

La ricerca condotta nell'ambito delle macchine e degli impianti dell'industria agroalimentare ha riguardato la prototipazione di macchine innovative ed impianti per il settore lattiero-caseario, oleario, distribuzione piatti pronti pre-confezionati e lo sviluppo di sistemi innovativi per il confezionamento di prodotti ortofrutticoli, con particolare riguardo all'ottimizzazione delle prestazioni funzionali di macchine ed impianti specifici, nonché l'implementazione di prototipi in impianti industriali, la sensoristica applicata agli impianti agroalimentari e lo studio di macchine e soluzioni impiantistiche per il trattamento e recupero di sottoprodotti dell'industria alimentare, il compostaggio di sottoprodotti e reflui delle industrie agroalimentari.

A. Matera is an academic researcher in Agricultural Mechanics, in the field of Agricultural, Forestry and Bio-Systems Engineering (07/C1), and holder of the course of Machines and plants for fresh and IV range products for the course in English of the master's degree in Food Science and Technology (LM70) at the University of Basilicata.

In 2020 he obtained his Ph.D. in Agricultural Mechanics (AGR/09) on the development and optimization of a breathable packaging system for horticultural products (I and IV range), based on a valve with selective properties to the gases-permeability. In 2018 he led the research team of IROST of Tehran (IRAN) in the development and development of experimental activities for the optimization of the shelf life of strawberries and first range mushrooms.

He has been speaking at various conferences and seminars, nationally and internationally, in the field of Agricultural, Food and Bio-Systems Engineering, developing research and indexed works in the field of the development of machines and prototypes for the improvement of food quality and safety.

He gathered many experiences in the field of analytical control and evaluation of the physical-mechanical, microbiological, chemical and spectrophotometric properties of food, evaluating the effect of microwaves and a heat treatment on food properties.

The research carried out in the field of machines and plants in the agri-food industry included the prototyping of innovative machines and systems for the dairy, olive oil sectors, ready-to-heat, and the development of innovative packaging systems for fruit and vegetables, with particular emphasis to the optimization of the functional performance of specific machines and plants, as well as the implementation of prototypes in industrial plants and sensors applied to agri-food plants, the study of machines and plant solutions for the treatment and recovery of food industry by-products, the composting of by-products and wastewater from the agri-food industries.

## Giovanni Carlo DI RENZO

( <https://orcid.org/0000-0003-3830-2517> )

G.C. Di Renzo è professore ordinario di Meccanica Agraria. Coordinatore del corso di Dottorato in Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari della SAFE – UNIBAS dal 13/05/2022 ad oggi. Direttore della Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari e Ambientali dell'UNIBAS dallo 01/10/2018 ad oggi. Responsabile del laboratorio MAC-LAB (<https://machimplab.wordpress.com/>) dallo 01/11/1994 ad oggi; Responsabile del laboratorio "Officina per l'innovazione e lo sviluppo nell'industria alimentare (OPSIA) dal 11/04/2016 ad oggi; Coordinatore dell'Area di ricerca di Tecnologie alimentari della Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari e Ambientali dal 20/07/2014 al 20/07/2017; Coordinatore del Corso di Laurea di Tecnologie Alimentari (L26) e di Scienze e Tecnologie Alimentari (LM70) dal 20/07/2014 30/09/2018; Prorettore Vicario dell'Università degli Studi della Basilicata dallo 01/10/2009 al 30/06/2014.

Le esperienze gestionali, scientifiche e professionali maturate nella realizzazione di impianti per la conservazione e lavorazione dei prodotti ortofrutticoli, per i caseifici, per le cantine, per gli oleifici, per la depurazione dei reflui, per il risparmio energetico nell'industria alimentare, integrate dalla pratica di laboratorio chimico e dalle conoscenze di automazione controllo dei processi agroindustriali, hanno reso il prof. Di Renzo un esperto nel settore dell'impiantistica per le industrie agroalimentari. Brevetti di cui è titolare: 1) 2018 - Dispositivo per il controllo degli scambi gassosi di contenitori per alimenti "Blow". Depositata domanda di brevetto italiano in data 28/05/2015 prot. 102015000018707. Domanda di brevetto internazionale n. PCT/IB2016/050600 del 05.02.2016. Brevetto EU pubblicato in data 26/12/2018 con il numero 3303174; 2) 2019 - Impianto per la separazione di liquidi altamente deperibili "Rotased". Brevetto italiano n. 2016000078140 del 28/01/2019; 3) 2021 – Macchina per applicare almeno un dispositivo per lo scambio gassoso di contenitori per prodotti alimentari Patent Pending n. 102021000007508 26/03/2021.

G.C. Di Renzo is full professor (Agricultural Mechanics), University of Basilicata, School of Science of Agriculture, Forestry, Food and Environment (SAFE). A.Y. 1994/1995 to current, lecturing the courses "Machines and plants for Food-industry Processing 1 and 2" in the Food Science Bachelor and Master degree. Coordinator of the PhD Course in Agricultural, Forestry and Food Sciences of SAFE - UNIBAS from 13 May 2022 to current; Director of the School of Agriculture, Forestry, Food and Environment Science (SAFE) of the Basilicata University, from the 01/10/2018 to current; Responsible of the Scientific laboratory MAC-LAB (<https://machimplab.wordpress.com/>) from the 01/11/1994 to current; President of Food Science Bachelor and Food Science and Technology MS degree from 01/07/2014 to 30/09/2019; Chairman of Patent Commission of Basilicata University from 01/03/2011 to 30/10/2014; Vice Rector of Basilicata University from 01/10/2009 to 30/06/2014.

The scientific and professional experience in design, working and operation analysis of machines and plants for the following industry: storage and processing of fruit and vegetables, dairy, wine, olive oil, and pasta. The experience gained combined with laboratory practice and knowledge of agro-industrial automation process control makes prof. Di Renzo an expert in the field of the plant and machines for food industries. Patents: 2018 - Device for controlling gaseous exchanges between the inside and outside of a container for solid or liquid food products. EU Patent number 3303174 (December 26th 2018). The European Commission recognized BlowDevice® micro-technology as "Key Technology" in Europe on the Innovation Radar Portal <https://www.innoradar.eu/innovation/33892>; 2) 2019 - Rotary sedimentator with vertical axis for the solid/liquid and liquid/liquid separation of liquid foods Italian Patent n. 2016000078140 (28/01/2019); 3) 2021 - Machine for applying at least one gas exchange control device to a packaging film Italian Patent Pending n. 102021000007508 26/03/2021.

## Indice dei Contenuti / Table of Contents

<b>Il Progetto IT4NUEVOO .....</b>	<b>1</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo.....</i>	<i>1</i>
Stato dell'arte .....	1
Inquadramento negli obiettivi del settore .....	5
Sintesi del Progetto .....	6
Ostacoli prevedibili .....	10
Ricadute e benefici del Progetto .....	10
Unità operative del Progetto.....	11
<b>The IT4NUEVOO Project.....</b>	<b>21</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo.....</i>	<i>21</i>
State of the art.....	21
Framing in the objectives of the sector.....	25
Project Summary .....	26
Predictable obstacles.....	29
Effects and benefits of the Project .....	30
Project Units .....	31
<b>Ricordo del prof. Paolo Amirante – Professore Emerito di Meccanica Agraria – Università degli Studi di Bari .....</b>	<b>39</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo .....</i>	<i>39</i>
L'insegnamento del Prof. Paolo Amirante: le Macchine e Impianti per le Industrie Agro-alimentari ....	39
50 anni di didattica e di ricerca nell'ambito delle discipline AGR/09 (Meccanica Agraria).....	39
<b>In memory of prof. Paolo Amirante – Professor Emeritus of Agricultural Mechanics – University of Bari .....</b>	<b>43</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo .....</i>	<i>43</i>
The teaching of Prof. Paolo Amirante: Machines and Plants for Agri-Food Industries.....	43
50 years of teaching and research in the field of AGR/09 (Agricultural Mechanics) .....	43
<b>Il Progetto IT4NUEVOO: relazione intermedia del Coordinatore .....</b>	<b>47</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo (Coordinatore Scientifico del Progetto).....</i>	<i>47</i>
Relazione di monitoraggio intermedia .....	47
<b>The IT4NUEVOO Project: Coordinator's mid-term report .....</b>	<b>57</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo (Coordinatore Scientifico del Progetto).....</i>	<i>57</i>
Mid-term monitoring report .....	57
<b>Il Progetto IT4NUEVOO: presentazione dei risultati ottenuti.....</b>	<b>65</b>
<i>Università della Basilicata - Aula Magna sede Campus Rione Francioso, 17 Novembre 2022 .....</i>	<i>65</i>
<b>The IT4NUEVOO Project: presentation of the achieved results.....</b>	<b>65</b>
<i>University of Basilicata - Aula Magna at "Rione Francioso" Campus, 17 November 2022.....</i>	<i>65</i>

## **Gli impianti di separazione olio / acqua per migliorare la qualità finale degli oli extravergini: valutazione tecnica e risultati sperimentali ..... 67**

*Attilio Matera\*, Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Giuseppe Genovese, Luciano Scarano, Giovanni Carlo Di Renzo..... 67*

Introduzione .....	67
Processo di estrazione dell'olio extra vergine d'oliva .....	68
Impianti per la chiarificazione del mosto oleoso.....	70
Parametri qualitativi dell'olio d'oliva .....	74
Attività sperimentali.....	75
Separazione con prototipo di separatore in atmosfera modificata a bassi giri (SAM) .....	82
Osservazioni conclusive sul prototipo di separatore in atmosfera modificata a bassi giri (SAM) .....	89
Bibliografia.....	90

## **Oil / water separation plants to improve the final quality of extra virgin olive oils: technical evaluation and experimental results ..... 91**

*Attilio Matera\*, Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Giuseppe Genovese, Luciano Scarano, Giovanni Carlo Di Renzo..... 91*

Introduction.....	91
Extra virgin olive oil extraction process.....	92
Plants for the clarification of oily must .....	94
Olive Oil Quality Parameters .....	97
Experimental activities .....	99
Separation with prototype in modified atmosphere at low rpm (SAM) .....	106
Concluding remarks on the prototype low-speed modified atmosphere separator (SAM) .....	113
References.....	114

## **Applicazione della tecnologia ad ultrasuoni ad alta potenza per il miglioramento del processo di estrazione degli olii vergini di oliva .....115**

*Roberto Romaniello\* ..... 115*

## **Application of high-power ultrasound technology for improving the extraction process of virgin olive oils .....123**

*Roberto Romaniello\* ..... 123*

## **Selezione e impiego di microrganismi per la produzione di olio extravergine di oliva con caratteristiche nutrizionali migliorate .....131**

*Teresa Zotta\*, Marilisa Giavalisco, Eugenio Parente, Emanuela Lavanga, Annamaria Ricciardi..... 131*

1. Introduzione .....	131
2. Materiali e Metodi.....	133
3. Risultati e discussioni.....	138
Riferimenti.....	150

## **Selection and use of microorganisms for the production of extravirgin olive oil with improved nutritional properties.....151**

<i>Teresa Zotta*, Marilisa Giavalisco, Eugenio Parente, Emanuela Lavanga, Annamaria Ricciardi</i> .....	151
1. Introduction .....	151
2. Materials and Methods .....	153
3. Results and discussion .....	158
References .....	170
<b>Effetto di tecnologie di estrazione innovative sulla qualità, la stabilità ossidativa e le caratteristiche organolettiche degli oli extravergini di oliva .....</b>	<b>171</b>
<i>Nicola Condelli*, Maria Di Cairano, Teresa Scarpa, Fernanda Galgano</i> .....	171
1. Introduzione .....	171
2. Materiali e metodi .....	173
3. Risultati e discussione.....	175
4. Bibliografia.....	181
<b>Effect of innovative extraction techniques on the quality, oxidative stability, and organoleptic properties of extra virgin olive oils .....</b>	<b>185</b>
<i>Nicola Condelli*, Maria Di Cairano, Teresa Scarpa, Fernanda Galgano</i> .....	185
1. Introduction .....	185
2. Materials and methods .....	187
3. Results and discussions .....	189
4. References .....	195
<b>Conclusioni finali del Progetto IT4NUEVOO .....</b>	<b>197</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo</i> .....	197
<b>Conclusions arising from the IT4NUEVOO Project .....</b>	<b>199</b>
<i>Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo</i> .....	199



---

## Il Progetto IT4NUEVOO

---

*Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

SITO WEB del Progetto IT4NUEVOO: <https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/>

### Stato dell'arte

L'olio extra-vergine di oliva (EVOO), in quanto estratto con un processo esclusivamente meccanico, oltre alla composizione di acidi grassi tipici, è caratterizzato da una moltitudine di altri composti che conferiscono le proprietà organolettiche, nutrizionali, salutari e di stabilità che lo differenziano dagli altri oli vegetali e lo rendono un componente fondamentale della dieta mediterranea.

Generalmente, la concentrazione di tali composti nell'olio è strettamente correlata con la cultivar delle olive utilizzate e con le condizioni ambientali dell'areale di produzione. Un ruolo determinante per mantenerli nell'olio estratto, o evitare il loro deterioramento, è svolto dalla tecnologia e dal protocollo di produzione. (Altieri et al., 2014, 2015).

Il diagramma di flusso del processo di estrazione meccanica dell'EVOO comprende tre fasi essenziali: a) la preparazione della pasta di olive (frantumazione/frangitura e gramolazione); b) la separazione dell'olio in una fase solida (sansa) ed una liquida nota come mosto oleoso (olio e acque vegetali); c) la separazione finale della fase liquida in olio e acque reflue.

Quindi, l'EVOO viene ottenuto attraverso un processo apparentemente semplice, costituito da poche fasi di lavorazione che, in rapida successione, portano al prodotto finito. Tuttavia, un'errata gestione dei parametri di processo e del protocollo di produzione può determinare drammatiche ricadute sulla qualità finale dell'olio prodotto. Per tale motivo, da diversi anni sono state condotte molteplici ricerche per migliorare il processo di estrazione dell'EVOO con lo sviluppo di nuove macchine o tecnologie (Leone et al., 2015; Romaniello et al., 2017), con l'ottimizzazione dei tempi e delle temperature di molitura, di gramolazione e della composizione dell'atmosfera nello spazio di testa durante la gramolazione (Leone et al., 2014, 2015; Tamborrino et al., 2014a).

Diversi studi hanno consentito di mettere in evidenza l'importanza delle caratteristiche costruttive dei decanter e dei relativi parametri di funzionamento, in relazione alle caratteristiche reologiche e chimico-fisiche delle paste, strettamente dipendenti dal rapporto tra fase solida e fasi liquide (acqua e olio) (Tamborrino et al., 2017, 2014b).

Ormai è noto che per rendere massima la qualità e la resa, è richiesto un accurato e costante controllo dei parametri di processo per adeguarli alle caratteristiche delle paste di olive da sottoporre ad estrazione (Altieri, 2010). Tale controllo è importante poiché le paste presentano un'elevata variabilità delle caratteristiche fisico-meccaniche da un anno all'altro, nel corso della stessa stagione e, talvolta, anche nella stessa giornata a causa delle diverse cultivar di appartenenza delle drupe lavorate, del contenuto idrico dei tessuti vegetali, dell'andamento climatico e del grado di maturazione.

I molteplici studi teorico-applicativi sul dimensionamento / funzionamento del decanter, finalizzati al miglioramento delle prestazioni quanti-qualitative durante l'estrazione dell'EVOO, hanno visto una forte integrazione fra il settore della produzione, i costruttori di impianti ed i ricercatori ed hanno consentito di pervenire alla definizione di decanter di nuova concezione (Tamborrino et al., 2015). Questi decanter sono in grado di produrre un mosto oleoso con un contenuto di acqua sensibilmente ridotto rispetto al passato e una qualità elevata dell'EVOO, senza penalizzare eccessivamente le rese di estrazione. Con tali decanter il mosto oleoso prodotto presenta un basso contenuto di acqua e di solidi sospesi, e risulta meno "difficile" da trattare nella separazione finale acqua/olio.

Pertanto, è stata studiata la possibilità di utilizzare una separazione "meno aggressiva" della centrifugazione, basata sulla sedimentazione, in modo da separare dal mosto oleoso una percentuale di olio di altissima qualità (fino al 90%), con caratteristiche comparabili a quelle dell'olio contenuto nelle olive d'origine, mentre l'olio residuo nel mosto è separato con il tradizionale separatore centrifugo a dischi (Altieri et al., 2014).

Il separatore centrifugo a dischi è una macchina estremamente efficiente ed efficace, poiché il campo centrifugo, creato nell'interno del tamburo con l'elevato numero di giri, consente di eseguire in modo eccellente la pulizia finale dell'olio. Anche se la manutenzione necessaria per questo dispositivo, legata prevalentemente al funzionamento dello scarico automatico dei solidi, rappresenta in alcuni casi un problema produttivo non trascurabile.

Tuttavia, a causa dell'elevata velocità di rotazione, l'azione sviluppata dai dischi si traduce in una azione meccanica sul fluido trattato "eccessiva" poiché determina un riscaldamento e un'intima miscelazione dell'olio con l'aria ambiente, con conseguente elevata diffusione di ossigeno, che è una delle cause di reazioni ossidative e perdita di numerosi composti pregiati presenti nel prodotto originale. Diversi lavori scientifici hanno messo in evidenza la perdita di corpo e l'eccessiva solubilizzazione di ossigeno nell'olio estratto, per effetto del passaggio nella centrifuga pulitrice impiegata per eliminare il residuo di acqua ed impurità ancora presenti dopo l'estrazione. (Pascale et al., 2018)

Tali modificazioni dovute al "processo di produzione" sono in sensibile contrasto con l'attuale e sempre maggiore attenzione dei consumatori alla qualità merceologica dell'EVOO, con un concetto di genuinità che collega il prodotto consumato alle olive d'origine. Tale idea si inserisce nell'ambito di un contesto di mercato di consumo che apprezza i "cloudy oils", ossia oli particolarmente verdi e ricchi di aromi, non filtrati e con torbidità stabile.

La separazione della sospensione olio/acqua mediante decantazione naturale (sedimentazione) è inadatta ai moderni processi industriali a causa della mancanza di controllo e dell'eccessivo tempo richiesto, con ricadute negative sull'organizzazione del processo produttivo e sulla qualità dell'olio prodotto. Tuttavia, la sedimentazione rappresenta una grande opportunità per ridurre i costi di produzione e migliorare la qualità dell'EVOO, qualora possa essere controllata e venga gestita in modo adeguato.

In tale contesto nel laboratorio MAC-Lab (<https://machimplab.wordpress.com/>) della SAFE dell'Università degli Studi della Basilicata si è giunti alla messa a punto di un nuovo sistema per la pulizia e separazione finale acqua/olio, chiamato Rotased, che è stato preliminarmente progettato tramite modellazione fluidodinamica 3D e successivamente costruito e provato in test preliminari presso diversi Oleifici.

Nell'ambito del progetto, inoltre, verrà valutato l'effetto di ceppi appartenenti alle specie di *L. plantarum* e *L. pentosus* sulle olive, prima e dopo la raccolta, per controllare il deterioramento

dovuto alla presenza di lieviti e preservare le proprietà e la qualità dell'olio d'oliva. I batteri lattici da tempo sono stati riconosciuti come membri importanti del microbiota delle olive da tavola fermentate grazie alla loro capacità di ridurre il pH, controllare i microrganismi deterioranti e idrolizzare l'oleuropeina.

I ceppi appartenenti alle specie del gruppo *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*, *L. pentosus*) sono tra i microrganismi che colonizzano le superfici delle olive e svolgono un ruolo fondamentale durante la fermentazione (Hurtado et al., 2012) grazie alla capacità di tollerare l'alto contenuto in fenoli, nonché di degradare gli stessi, se pur lentamente (Rodriguez et al., 2008a, 2008b, Landete et al., 2008; Esteban-Torres et al., 2013).

Di recente, è stato riconosciuto il ruolo dei microrganismi anche nella qualità e nel deterioramento dell'olio extravergine di oliva. I lieviti sono considerati i principali componenti del microbiota delle olive e dell'olio di oliva durante la lavorazione e la conservazione (Ciardini e Zullo, 2018), e diverse specie sono state coinvolte in processi di deterioramento.

I ceppi di *L. plantarum*, al contrario, sono in grado di migliorare la qualità dell'olio d'oliva, degradando i composti amari e riducendo i fenomeni ossidativi grazie all'attività antiossidante (Kachouri and Hamdi, 2004, 2006; Kachouri et al., 2015; Sherani et al., 2018).

Alcuni ceppi, inoltre, sono in grado di compiere un metabolismo aerobio e respirativo attraverso l'attività dell'enzima piruvato ossidasi e la sintesi di una catena di trasporto degli elettroni in presenza dei cofattori eme e menachinone (Parente et al., 2010; Guidone et al., 2013; Zotta et al., 2017). I fenotipi ossigeno-tolleranti e respirativi di *L. plantarum* hanno una maggiore capacità di degradare le specie reattive dell'ossigeno (ROS; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicali liberi) grazie alla sintesi di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi eme-dipendente; Li et al., 2012; Zotta et al., 2013).

Il miglioramento delle caratteristiche nutrizionali degli oli ottenuti con impianti e tecnologie innovative, arrivando ad un contenuto di idrossitirosole di almeno 250 mg /kg di olio, può essere sfruttato per consentire di utilizzare un'etichetta che riporti un'indicazione salutistica del tipo "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" (claim autorizzato dall'EFSA- Reg. 1924/2006). Deve inoltre essere accompagnato dalla frase "L'effetto benefico si ottiene con l'assunzione giornaliera di 20 g di olio d'oliva".

- Altieri G., (2010). Comparative trials and an empirical model to assess throughput indices in olive oil extraction by decanter centrifuge. *Journal of Food Engineering*, 97: 46-56.
- Altieri G., Di Renzo G.C., Genovese F., Tauriello A., D'Auria M., Racioppi R., Viggiani L., (2014). Olive oil quality improvement using a natural sedimentation plant at industrial scale. *Biosystem Engineering*, 122(6): 99-114.
- Altieri G., Genovese F., Tauriello, A., & Di Renzo, G. C. (2015). Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 166, 325–334.
- Ciardini, G., Zullo B.A. (2018). Virgin Olive Oil Yeasts: a Review. *Food Microbiology* 70: 245–53. doi:10.1016/j.fm.2017.10.010.
- Guidone A, Ianniello R. G. Ricciardi A., Zotta T. , Parente E. (2013). Aerobic Metabolism and Oxidative Stress Tolerance in the *Lactobacillus Plantarum* Group. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (9).
- Esteban-Torres M., Reverón I. , Mancheño J.M., de las Rivas B., Muñoz R. (2013). Characterization of the First Feruloyl Esterase From *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.01523-13.

- Hurtado A., Reguant C., Bordons A., Rozès N. (2012). Lactic Acid Bacteria From Fermented Table Olives. *Food Microbiology* 31 (1): 1-8.
- Kachouri Faten, Hamdi M.. (2004). Enhancement of Polyphenols in Olive Oil by Contact with Fermented Olive Mill Wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* 39 (7): 841–45.
- Kachouri F., Hamdi M. (2006). Use *Lactobacillus plantarum* in Olive Oil Process and Improvement of Phenolic Compounds Content. *Journal of Food Engineering* 77 (3): 746–52.
- Kachouri F., Ksontini H., Kraiem M., Sett K., Mechmeche M., Hamdi M.. (2015). Involvement of Antioxidant Activity of *Lactobacillus Plantarum* on Functional Properties of Olive Phenolic Compounds. *Journal of Food Science and Technology* (Mysore) 52 (12). Springer India: 7924–33.
- Landete J. M., Curiel J.A , Rodriguez H., de las Rivas B., Munoz R. 2008. Study of the Inhibitory Activity of Phenolic Compounds Found in Olive Products and Their Degradation by *Lactobacillus plantarum* Strains." *Food Chemistry* 107 (1): 320–26.
- Pascale R. , Bianco G. , Cataldi T. R., Buchicchio A., Losito I., Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G.C., Lafiosca M.C. (2018). Investigation of the Effects of Virgin Olive Oil Cleaning Systems on the Secoiridoid Aglycone Content Using High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95: 665-671.
- Rodríguez H., Landete J.M., Curiel J.A., de las Rivas B., Mancheño J.M., Muñoz R. (2008°). Characterization of the P-Coumaric Acid Decarboxylase From *Lactobacillus plantarum* CECT 748T." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (9): 3068–72.
- Rodriguez H., Landete JM ,Rivas B , Munoz R. (2008b). Metabolism of Food Phenolic Acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry* 107 (4): 1393–98.
- Zotta, T., Ianniello R.G , Guidone A., Parente E., Ricciardi A. (2013). Selection of Mutants Tolerant of Oxidative Stress From Respiratory Cultures of *Lactobacillus plantarum* C17. *Journal of Applied Microbiology* 116 (3): 632–43.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. (2017). Aerobic Metabolism in the Genus *Lactobacillus*: Impact on Stress Response and Potential Applications in the Food Industry. *Journal of Applied Microbiology* 122 (4): 857–69.
- Tamborrino A., Squeo G., Leone A., Paradiso V.M., Romaniello R., Summo C., Pasqualone A., Catalano P., Bianchi B., Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205: 34-46.
- Romaniello R., Leone A., Tamborrino A. (2017). Specification of a new de-stoner machine: evaluation of machining effects on olive paste's rheology and olive oil yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 115-121.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2015). Mathematical modelling of the performance parameters of a new decanter centrifuge generation. *Journal of Food Engineering*, 166: 10-20.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E., De Bellis,L, Tamborrino, A. (2015). Machining effects of different mechanical crushers on pit particle size and oil drop distribution in olive paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117: 1271-1279.
- Tamborrino A., Leone A., Romaniello R., Catalano P., Bianchi B. (2015). Comparative experiments to assess the performance of an innovative horizontal centrifuge working in a continuous olive oil plant. *Biosystems Engineering*, 129: 160-168.
- Tamborrino A., Pati S., Romaniello R., Quinto M., Zagaria R., Leone A. (2014a). Design and

implementation of an automatically controlled malaxer pilot plant equipped with an in-line oxygen injection system into the olive paste. *Journal of Food Engineering*, 141:1-12.

- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2014). Development of a prototype malaxer to investigate the influence of oxygen on extra-virgin olive oil quality and yield, to define a new design of machine. *Biosystem Engineering*, 118: 95–104.
- Tamborrino A., Catalano P., Leone A. (2014b). Using an in-line rotating torque transducer to study the rheological aspects of malaxed olive paste. *Journal of Food Engineering*, 126: 65–71.

### **Inquadramento negli obiettivi del settore**

Il progetto proposto ha come obiettivo di ottimizzare il processo di estrazione esistente al fine di migliorare le rese di estrazione della materia grassa e delle sostanze antiossidanti presenti nelle drupe.

La ricerca industriale e lo sviluppo sperimentale del progetto ITI4NUEVOO sono finalizzati allo sviluppo di un nuovo prodotto alimentare denominato NUEVOO e alla messa a punto di un protocollo di produzione che integri il ciclo produttivo con nuove macchine per il migliorare l'estrazione dei composti polifenolici.

Ciò considerato, il progetto ITI4NUEVOO risulta perfettamente coerente con quanto già previsto dalla Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente avente l'obiettivo di creare e stimolare un ambiente favorevole allo sviluppo di progetti rilevanti che consentano di applicare e valorizzare le conoscenze in materia di ricerca scientifica ed innovazione tecnologica.

Inoltre, il progetto risulta altresì in linea con il Piano strategico per l'innovazione e la ricerca nel settore agricolo, redatto dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, è particolarmente coerente con alcune delle AREE tematiche ritenute prioritarie ed in particolare si colloca nell'AREA 4 riguardante la "Qualità e tipicità dei prodotti agricoli, sicurezza degli alimenti e stili di vita sani" innestandosi nella linea di attività b) "Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione" .

Inoltre, in generale, il progetto risponde anche a tutta una serie di obiettivi indicati nelle aree tematiche 1, 3, 4 e 6 come di seguito esplicitato.

#### ***- AREA 1. Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agro-ecosistemi***

L'estrazione di composti bioattivi consente di perseguire diversi obiettivi previsti dall'Area 1 e nello specifico l'uso sostenibile dei nutrienti e l'ottimizzazione dei processi produttivi attraverso un miglioramento della produzione e della sua redditività oltre alla riduzione degli sprechi ed all'uso più efficiente delle risorse agro-alimentari.

#### ***- AREA 3. Coordinamento e integrazione dei processi di filiera e potenziamento del ruolo dell'agricoltura***

La proposta progettuale è in linea anche con gli obiettivi dell'area 3 in quanto prevede l'utilizzo di tecnologie a basso impatto per l'estrazione dei composti bioattivi (estrazione, separazione, concentrazione, ecc.) senza l'impiego di coadiuvanti e/o solventi ma tuttavia

rivalorizzando gli scarti della produzione primaria. E' previsto, inoltre, lo sviluppo di nuovi prodotti con effetti diretti sull'integrazione dei processi della filiera di trasformazione.

#### **- AREA 4. Qualità e tipicità dei prodotti agricoli, sicurezza degli alimenti e stili di vita sani**

Le attività previste consentono di ridurre gli sprechi alimentari e di valorizzare il loro riutilizzo e sono rivolte alla produzione di alimenti funzionali innovativi per l'alimentazione umana, con specifiche caratteristiche nutrizionali, più rispondenti alle attuali richieste del mercato ed adeguamento dei relativi standard di certificazione.

#### **- AREA 6. Sviluppo e riorganizzazione del sistema della conoscenza**

Sono previste attività volte alla promozione del trasferimento della conoscenza e dell'innovazione con metodi che favoriscono e facilitano l'adozione dell'innovazione all'interno del contesto aziendale.

Inoltre, il progetto proposto è in sintonia con le linee guida comunitarie dettate dal REGOLAMENTO (UE) N. 1305/2013 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 dicembre 2013 che delinea gli obiettivi e le priorità in materia di sostegno allo sviluppo rurale. Infatti, il progetto risulta in linea con gli obiettivi di stimolare la competitività del settore agricolo; di garantire la gestione sostenibile delle risorse agricole e naturali e l'azione per il clima; di realizzare uno sviluppo territoriale equilibrato delle economie e comunità rurali, compresi la creazione e il mantenimento di posti di lavoro.

Infine, il progetto promuove il trasferimento di conoscenze e l'innovazione nel settore agricolo e nelle zone rurali; sostiene il potenziamento della redditività delle aziende agricole e della loro competitività in tutte le sue forme promuovendo tecnologie innovative per le aziende agricole; consente di preservare, ripristinare e valorizzare gli ecosistemi connessi all'agricoltura, in particolare promuovendo una migliore gestione/valorizzazione delle produzioni.

#### **Sintesi del Progetto**

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di ottimizzare il processo di estrazione esistente al fine di migliorare le rese di estrazione della materia grassa e delle sostanze antiossidanti presenti nelle drupe, con lo sviluppo di un nuovo protocollo basato su impianti innovativi e tecniche di fermentazione che consentano di incrementare il livello di idrossitirosolo e suoi derivati (ad es. oleuropeina + tirosolo) arrivando a un contenuto di idrossitirosolo di almeno 250 mg/kg di olio in modo da poter utilizzare in etichetta il claim autorizzato dall'EFSA (Reg. 1924/2006) "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo". Infatti tale Claim può essere impiegato solo se l'EVOO contiene almeno 5 mg di idrossitirosolo e suoi derivati per 20 g di olio d'oliva (250 mg/1000 g). Naturalmente per il consumo è necessario che sull'etichetta sia indicato il consumo minimo giornaliero pari a: "assunzione giornaliera di 20 g di olio d'oliva".

Il progetto è articolato in quattro Work-Package (WP) con le relative sotto articolazioni.

### ***WP1 COORDINAMENTO***

nell'ambito del quale sarà prevista l'assicurazione della corretta attuazione del progetto (avvio, esecuzione e chiusura del progetto); il rispetto degli obblighi contrattuali, il piano di lavoro e il budget; la gestione efficace delle pratiche di lavoro positive ed efficaci da condividere tra tutti i partner.

### ***WP2 DEFINIZIONE DELL'IMPIANTISTICA PER LA PRODUZIONE DEL NUEVOO***

nell'ambito del quale verrà: 1) Riorganizzato il layout dell'impianti di estrazione olearia introducendo nuove tecnologie per il condizionamento delle paste di olive. In particolare sarà implementato, in un impianto di estrazione olearia e testato in produzioni di livello industriale, un sistema a ultrasuoni per migliorare il trattamento delle paste di olive al fine di aumentare la resa di estrazione dell'olio e il contenuto di composti ad alto valore salutistico (es. sostanze fenoliche); 2) Sviluppato un nuovo sistema di separazione acqua olio da interporre tra il decanter e il separatore centrifugo a dischi, al fine di salvaguardare dall'ossidazione l'EVOO e di creare le condizioni ottimali per massimizzare l'estrazione di idrossitiroso e suoi derivati, comparando l'EVOO estratto in modo tradizionale con il NUEVOO estratto da olive/paste di olive inoculate con Lattobacilli.

### ***WP3 VALORIZZAZIONE A FINI NUTRACEUTICI DEL NUEVOO***

in cui verrà valutata la possibilità di utilizzare colture starter di batteri lattici, appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum* e *L. pentosus*, isolati da olive ed estratti di olii, per la valorizzazione delle proprietà nutraceutiche e nutrizionali dell'EVOO. L'impatto delle innovazioni introdotte sulla qualità dell'olio e sulle sue proprietà nutraceutiche sarà valutato mediante una combinazione di analisi chimiche, fisiche e sensoriali: una valutazione chimica e sensoriale e di stabilità ossidativa degli olii sperimentali ottenuti e confrontati con quelli ottenuti convenzionalmente. Verrà altresì effettuata una stima della shelf-life (per predizione e per valutazione dei campioni a tempi diversi dalla produzione). Verranno peraltro fornite indicazioni relative alla valorizzazione del NUEVOO non solo per il consumo diretto, ma in combinazione con altri prodotti per realizzare condimenti/salse e alimenti complessi.

### ***WP4 PIANO DI SFRUTTAMENTO DEI RISULTATI, RICADUTE E DIVULGAZIONE DEI RISULTATI***

questa fase verrà articolata in eventi formativi per gli operatori del settore e di divulgazione alla comunità scientifica e operatori del settore a livello nazionale e internazionale dei risultati e conoscenze acquisite attraverso il progetto di ricerca.

Le Linee di attività per i diversi WP sono le seguenti.

#### ***WP1***

Incontri periodici e organizzazione di riunioni. Inoltre, è prevista la compilazione di schede di monitoraggio fisico e finanziario del progetto con l'implementazione di una procedura di gestione on line.

**WP2**

Valutazione di un impianto a ultrasuoni per il condizionamento delle paste di olive per mezzo di prove comparative, fino alla definizione di un protocollo di utilizzo e la progettazione, la costruzione e il brevetto di un separatore olio/acqua/morchia per migliorare la qualità finale di EVOO. Sviluppo di un nuovo sistema di separazione acqua olio da interporre tra il decanter e il separatore centrifugo a dischi, al fine di salvaguardare dall'ossidazione l'EVOO e di creare le condizioni ottimali per massimizzare l'estrazione di idrossitirosolo e suoi derivati.

**WP3**

Isolamento da olive ed estratti di olii di batteri lattici. Screening per la loro capacità antiossidante e di tollerare polifenoli e la capacità di degradare fenoli. Caratterizzazione tecnologica e tassonomica dei ceppi selezionati da utilizzare come colture starter per la produzione di olii ed estratti, con proprietà nutraceutiche. Inoculo di olive (pre e post raccolta) con ceppi di lattobacilli per il controllo del deterioramento e per migliorare le proprietà dell'olio di oliva. Produzione di olii ed estratti ottenuti con il sistema tradizionale e innovativo, con e senza inoculo di colture di batteri lattici aggiuntivi. Valutazione dei prodotti ottenuti attraverso una caratterizzazione chimica, con particolare riferimento, oltre ai parametri di qualità stabiliti dalla normativa vigente, alle sostanze fenoliche e vitaminiche ed all'attività antiossidante, allo scopo di verificare l'efficacia dell'impatto della tecnologia applicata sul valore nutraceutico dell'olio. Sarà altresì valutata la stabilità ossidativa degli olii sperimentali, confrontati con quelli convenzionalmente prodotti, nonché la shelf-life (per predizione e per valutazione dei campioni a tempi diversi dalla produzione). Sarà inoltre effettuata l'analisi sensoriale quantitativa descrittiva e di valutazione del gradimento dei nuovi alimenti formulati ad elevato valore aggiunto.

**WP4**

Organizzazione di seminari destinati alla divulgazione specifica dei risultati del progetto presso gli oleifici ("Field day"); la definizione di forme intermedie di divulgazione (comunicati stampa, riviste divulgative, workshop e seminari; la preparazione di pubblicazioni scientifiche, tecniche e divulgative dei risultati parziali e complessivi delle attività effettuate nelle corrispondenti aree di interesse scientifico nazionale ed internazionale. Partecipazione a convegni nazionali ed internazionali dei ricercatori delle diverse UO. Utilizzo dei risultati per l'elaborazione di materiale didattico nell'ambito di corsi di formazione nel settore e di didattica in corsi di laurea pertinenti. Realizzazione di video e/o video lezioni per la divulgazione in rete dell'approccio metodologico e i risultati conseguiti.

Tenendo conto della partnership delle due Istituzioni di ricerca che, a livello Italiano, presentano la maggiore esperienza nella ricerca sulle tecniche di estrazione dell'olio d'oliva, i risultati attesi dal progetto sono:

- la progettazione e realizzazione di un protocollo innovativo per produrre un nuovo olio extravergine di oliva (NUE-VOO) con una migliore qualità (cioè un contenuto

antiossidante potenziato) e un gusto sensoriale molto alto basato su tecnologie e impianti innovativi;

- la realizzazione di un nuovo prodotto il “NUEVOO” ad elevato valore nutrizionale e nutraceutico e lo sviluppo di un protocollo di produzione che potrebbe diventare il riferimento per la moltitudine di frantoi micro, piccoli e medi pre-senti nel Paese.

Pertanto, l’ambizione di questo progetto è la produzione di un nuovo prodotto alimentare denominato NUEVOO, con proprietà nutraceutiche che potrebbe essere utilizzato per la preparazione di salse o condimenti ovvero la cottura.

Per quanto riguarda la qualità e le proprietà salutari l’obiettivo è di ottenere un EVOO con caratteristiche tali da renderlo così differente dall’EVOO tradizionale e dagli altri oli o grassi vegetali, da poterlo considerare nuovo e quindi chiamarlo NUEVOO.

Considerando che l’alto contenuto di composti sani potrebbe aumentare l’amarezza ovvero potrebbe essere non gradevole al gusto, per creare un’altra opportunità di commercializzazione per i produttori di olio d’oliva il progetto esplorerà la possibilità di produrre prodotti nutraceutici innovativi basati sul NUEVOO come condimenti per insalate e salse.

L’altra ambizione del progetto NUEVOO è quella di sviluppare un protocollo di produzione che integri il ciclo produttivo con nuove macchine per il migliorare l’estrazione dei composti polifenolici.

Come prodotti della ricerca è prevista la realizzazione di:

- n. 1 NUEVOO (nuova tipologia di olio extravergine) con un contenuto di polifenoli superiore del 50% rispetto all’EVOO normalmente prodotto e al gusto e sapore gradevoli ed equilibrati;
- n. 1 prodotto nutraceutico (condimento e maionese italiani ad alto contenuto di antiossidanti);
- n.1 progetto di gramola innovativa diversa rispetto ad altre esistenti sul mercato. Capace di lavorare in atmosfera modificata (MA), lame rotanti e superficie interna in grado di produrre un’elevata azione abrasiva sulla pasta, dotata di un sistema di estrazione ad ultrasuoni
- n.1 progetto di separatore innovativo di olio / acqua / solido basato su una delicata separazione di acqua e olio (IMS). Dal punto di vista commerciale, oggi vi è un grande interesse per l’olio d’oliva di minima lavorazione perché, considerato dal consumatore più vicino, per quanto riguarda la composizione, all’olio originale presente nell’oliva, quindi l’uso di separatori centrifughi a dischi verticali interferisce con l’olio finale rispetto alla qualità percepita dai consumatori. Sarà anche condotto uno studio fluidodinamico dell’apparato IMS per ottimizzare e adattare la velocità di rotazione alle caratteristiche del mosto oleoso misurate tramite sensori in linea (come contenuto di olio, contenuto di acqua, torbidità, ecc.).
- n. 1 protocollo di estrazione EVOO per la produzione di NUEVOO basato sui risultati di precedenti ricerche sull’opera-zione di frantumazione / macinazione ed estrazione

integrata con i risultati / macchine / strategie tecnologiche innovative per l'estrazione di EVOO per la produzione di NUEVOO, ottenuta dalla presente proposta di ricerca.

### **Ostacoli prevedibili**

- Difficoltà nell'estrazione dei composti antiossidanti. Tale ostacolo verrà rimosso prevedendo un protocollo di prova articolato su due diverse strategie: la salvaguardia degli antiossidanti presenti evitando ogni tipologia di operazione che possa determinare una riduzione o decadimento degli stessi. Si intende far riferimento a: l'eliminazione dell'aggiunta di acqua di rete durante le diverse fasi di estrazione; miglioramento dell'azione meccanica sulla struttura cellulare della polpa della drupa per migliorare la fuoriuscita delle sostanze antiossidanti; azione microbica per modificare il pH della soluzione di acqua vegetale presente per consentire una maggiore solubilizzazione.
- La variabilità della materia prima. Per le prove verranno coinvolte aziende produttrici di grandi dimensioni in grado di poter fornire lotti omogenei di olive, per le diverse varietà. Si consideri che la ricerca verrà svolta tra la Puglia e la Basilicata e che sono già radicati i rapporti di collaborazione con le aziende produttrici di olive.
- Resistenza dei produttori di olio a produrre il NUEVOO. Questo rappresenta uno dei principali ostacoli al progetto, poiché produrre una nuova tipologia di olio non è facile in un mercato caratterizzato da elevata concorrenza a livello nazionale e internazionale e nel quale i fattori di qualità che concorrono alla definizione del prezzo sono ancora quelli tradizionali. Tuttavia, i Proponenti del progetto da anni collaborano con produttori "illuminati" che hanno la consapevolezza di dover migliorare le caratteristiche nutrizionali del prodotto per poter spuntare sul mercato dei prezzi maggiormente remunerativi rispetto agli attuali e per poter estendere a nuovi mercati il consumo dell'EVOO.
- Il livello di formazione degli operatori addetti alla produzione non all'altezza delle tecnologie proposte dal progetto. L'azione correttiva per tale ostacolo passa attraverso l'assistenza che il personale altamente qualificato delle due unità operative darà al personale degli oleifici che verranno coinvolti nella sperimentazione. In tal modo sarà possibile-le applicare in modo corretto il protocollo e formare il personale addetto alla linea di produzione. La formazione poi sarà completata con gli eventi previsti nelle azioni di comunicazione.

### **Ricadute e benefici del Progetto**

Ogni produttore di EVOO è consapevole che la qualità dell'olio prodotto ha un ruolo chiave nella strategia per incoraggiare nuove occasioni di consumo e affrontare le sfide di un mercato globale. Tuttavia allo stato attuale in tutti i Paesi produttori è sensibilmente più alta la quantità di VOO di scarsa qualità piuttosto che di EVOO.

Dall'analisi di contesto è evidente che la dimensione aziendale degli oleifici (micro e piccola PMI) rende molto difficile o impossibile l'investimento nella ricerca per sviluppare tecnologie, protocolli di estrazione o nuovi prodotti. Gli oleifici funzionano solo 1 - 2 mesi/anno, quindi non

possono permettersi i costi di ricerca e sviluppo di nuove tecnologie personalizzate in base alle specifiche esigenze industriali e molto distanti dalla ricerca svolta in laboratorio. Dall'altra parte, il consumatore richiede un prodotto di alta qualità e con caratteristiche salutistiche e possibilmente nutraceutiche.

Per questo motivo, in molti diversi studi e progetti realizzati per sviluppare e verificare come la singola operazione e il parametro / tecnica tecnologica influenzano il tasso di estrazione dell'olio e in alcuni casi, la qualità dell'olio di oliva non è sufficiente.

Infatti, tutti i risultati riportati sono influenzati dall'elevata variabilità, come molti Autori riportano, a causa di molti fattori esterni.

Pertanto, il legame intercorrente fra le singole operazioni tecnologiche / parametri con la qualità e le proprietà salutari risultano, fino ad ora, labili e non ben definiti a causa di fattori incontrollati.

Partendo dalle considerazioni precedenti e dalle opportunità offerte dal bando, il progetto darà i seguenti benefici:

- ottimizzazione del processo di estrazione esistente con uno sviluppo tecnologico gestibile e sostenibile;
- sviluppo di una nuova tipologia di olio extravergine di oliva con proprietà nutraceutiche e salutari (cioè un contenuto antiossidante potenziato) e un gusto sensoriale molto alto;
- sviluppo di uno specifico protocollo di estrazione (EP) che potrebbe diventare il riferimento per la moltitudine di OM micro, piccoli e medi;
- rafforzamento dell'immagine dell'EVOO come prodotto salutare e aumento dei consumi;
- sviluppo di nuove modifiche/macchine in grado di valorizzare le caratteristiche dell'olio prodotto (nuova gramola, nuovo approccio tecnologico, nuovo sistema di separazione);
- sviluppo di un protocollo di trattamento microbiologico dell'olio per aumentarne le caratteristiche nutrizionali; sviluppo di nuovi prodotti come salse/condimenti a base di NUEVOO.

## **Unità operative del Progetto**

### ***Descrizione Università degli Studi della Basilicata – Scuola di Scienze Agrarie SAFE***

I gruppi di ricerca della SAFE coinvolti hanno dotazioni infrastrutturali e di personale altamente qualificate per l'esecuzione di attività di ricerche e sviluppo nel settore delle Scienze e Tecnologie Alimentari. Infatti, il patrimonio di attrezzature scientifiche e di impianti pilota associato a un gruppo di lavoro con una forte connotazione interdisciplinare e con una grande esperienza in laboratorio ed operativa sugli impianti di produzione, rende la struttura di ricerca della SAFE un'eccellenza nella ricerca nel settore alimentare a livello nazionale e internazionale.

In particolare sono disponibili le competenze per affrontare, con metodologie innovative, sia lo studio dei processi biochimici fondamentali, sia gli aspetti tecnici legati alla definizione e valutazione di processi per la produzione di alimenti, per la valutazione dell'idoneità di materie

prime e fattori di produzione abiotici nelle trasformazioni alimentari, produzione di alimenti funzionali, valutazione sensoriale degli alimenti, verifica dell'eventuale presenza di sostanze pregiudicanti la sicurezza di prodotti alimentari, processi tecnologici e biotecnologici di produzione per prodotti di elevata qualità e legati alla tradizione alimentare italiana, conservazione e condizionamento nelle industrie agro-alimentari, sviluppo di processi produttivi sostenibili, la scelta, lo sviluppo e la costruzione di macchine, impianti e strumentazioni, anche per l'automazione, dedicate in modo specifico all'industria alimentare.

In particolare sono presenti 3 macro-gruppi di ricerca, ognuno dei quali contribuisce con specifiche infrastrutture e attrezzature ed una società di spin-off (Ninetek Innovazioni per l'agro-industria srl), che rappresenta il braccio operativo per il trasferimento tecnologico e la prototipazione.

Il Progetto prevede la collaborazione di 3 gruppi di Ricerca afferenti alla Scuola di Scienze Agrarie dell'Università degli Studi della Basilicata:

- il Gruppo di Impianti e Automazione (Prof. Giovanni Carlo Di Renzo, Prof. Giuseppe Altieri, Dr. Francesco Genovese)
- il Gruppo di Microbiologia Industriale (Prof.ssa Annamaria Ricciardi)
- il Gruppo di Tecnologie alimentari (Prof.ssa Fernanda Galgano, Dr.ssa Marisa Carmela Caruso)

Le strutture di ricerca e sviluppo e di progettazione afferenti ai gruppi saranno coinvolte nel progetto, con il personale di supporto afferente nelle stesse e con le attrezzature sia standard che di particolare rilievo in uso al loro interno disponibili per realizzare gli obiettivi progettuali.

I 3 Gruppi di Ricerca dispongono di laboratori provvisti di moderne attrezzature per la ricerca di base e applicata, oltre ad un impianto pilota per l'estrazione olearia e vari altri impianti pilota per le produzioni casearie.

Il Laboratorio di Microbiologia dispone delle seguenti unità (laboratori): Microbiologia Industriale; Multifunzionale; Fisiologia dei microrganismi (sezione batteri).

Il Laboratorio di Impianti e Automazione dispone delle seguenti unità (laboratori): Proprietà fisico meccaniche degli alimenti. Impianti pilota per l'estrazione olearia. Impianti pilota per le produzioni casearie.

Il Laboratorio di Tecnologie Alimentari dispone delle seguenti unità (laboratori): Chimica degli alimenti; Analisi sensoriale; Lab. Analitico di Tecnologie Alimentari; Condizionamento dei prodotti alimentari; Fluidi supercritici.

Nel corso degli anni hanno partecipato a numerosi progetti regionali e nazionali, consolidando rapporti di collaborazione con imprese del settore agroalimentare per lo sviluppo di processi e prodotti innovativi.

Negli anni sono stati gestiti diversi progetti attinenti la tematica di ricerca che vengono di seguito richiamati:

- PRIN 2004 Valorizzazione dell' "origine" nell'ambito della filiera olivicola: ruolo del territorio, della certificazione e della tracciabilità in funzione della sicurezza alimentare e dell'internazionalizzazione dei mercati. (OLIOAUTENTICO)
- PRIN-2008 Analisi, comprensione e sfruttamento della diversità e della regolazione della risposta allo stress in *Lactobacillus plantarum*
- Progetto Baby Cresci Sano (BCS) – ricerca industriale e sviluppo sperimentale di alimenti destinati all'infanzia, a base oleosa, arricchiti con vitamine liposolubili (A, E, D, K) e B6 resa liposolubile”, convenzione di ricerca con AREA Science Park Trieste- (2010-2011)
- Progetto OLIVA INFORNATA – ricerca industriale e sviluppo sperimentale per l'ottimizzazione del processo produttivo e di conservazione dell'oliva infornata”, convenzione di ricerca con AREA Science Park Trieste. 2010-2012.
- Progetto Ministeriale FIRB-2010 Futuro in Ricerca “Basi genetiche e fisiologiche del metabolismo aerobio in *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*: aspetti di base e applicative” (2011-2013).
- N. 2 Convenzioni di Ricerca Ditta Sacco s.r.l – Scuola SAFE nell'ambito del Progetto il progetto Profsicuri 2 (Prodotti Freschi: Sistemi innovativi per garantire serbevolezza, sicurezza, identità e qualità dalla produzione al consumo), domanda DM29187 del 31/03/2006 (2013-2014)
- Convenzione di Ricerca Ditta Basso Fedele e Figli s.r.l – Scuola SAFE nell'ambito del Progetto il progetto Profsicuri 2 (Prodotti Freschi: Sistemi innovativi per garantire serbevolezza, sicurezza, identità e qualità dalla produzione al consumo), domanda DM29187 del 31/03/2006 (2013-2014)
- Progetto EUFOLIA Mediterranea "Valutazione della qualità chimico-fisica degli oli provenienti da olivi condotti secondo le tecnologie colturali a basso impatto” . Bando misura 124 - PSR Basilicata 2007 - 2013. (2013-2015)
- Progetto Regionale PIF - Improvement of agro-food production of Basilicata Region: cheese, olive oil, wine, pasta and fresh fruit and vegetables (2014-2015).
- Consulenza per il progetto Horizon 2020 – IoF2020 n.731884 attualmente è in corso dallo 01/01/2017 in corso;
- Progetto Horizon 2020 - MyPack n.774265 per il quale allo stato attuale è in corso la firma del Project Agreement.

Di seguito si riportano le pubblicazioni più significative degli ultimi 5 anni (2013-2018).

- Zotta T., Ianniello R.G., Guidone A., Parente E., Ricciardi, A. (2013). Selection of mutants tolerant of oxidative stress from respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 632-643.
- Zotta T., Ianniello R.G., Guidone A., Parente E., Ricciardi A. (2013). Selection of Mutants Tolerant of Oxidative Stress From Respiratory Cultures of *Lactobacillus plantarum* C17.” *Journal of Applied Microbiology*, 116 (3): 632–43
- Altieri G., Di Renzo G.C., Genovese F., Tauriello A., D'auria M., Racioppi R., Viggiani F. (2014). Olive oil quality improvement using a natural sedimentation plant at industrial

scale». *Biosystems Engineering* 122: 99–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.04.007>.

- Guidone A., Zotta T., Ross R.P., Stanton C., Rea M.C., Parente, E., Ricciardi A. (2014). Functional properties of *Lactobacillus plantarum*: a multivariate screening study. *LTW-Food Science and Technology*, 56: 69-76.
- Ricciardi A., Parente E., Tramutola A., Guidone A., Ianniello R.G., Pavlidis D., Tsakalidou E., Zotta T. (2014). Evaluation of a differential medium for the preliminary identification of members of the *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* groups, *Annals of Microbiology*, 65: 1649-1658.
- Ricciardi A., Castiglione Morelli M.A., Ianniello R.G., Parente E., Zotta T. (2014). Metabolic profiling and stress response of anaerobic and respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17 grown in a chemically defined medium. *Annals of Microbiology*, 65: 1639-1648.
- Ricciardi, A., Ianniello, R.G., Parente, E., Zotta, T. (2015). Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/jam.12894.
- Caruso M.C., Galgano F., Pecora M., Tolve R., Verrastro M., Favati F. (2015). Improvement of Analytical Methods for the Determination of Polyphenolic Bioactive Compounds in Berry Fruits. *Journal of Chemistry*.
- Genovese F., Altieri G., Di Renzo G. C. (2015). Anaerobic digestion potential to reduce livestock waste environmental impact: a case study in Basilicata region (Italy). In *New trends in the ecological and biological research*, 47–47. Presov - SVK: University of Presov, 2015.
- Admane N., Verrastro V., Altieri G., Genovese F., Tarricone L., Ippolito A., Di Renzo G. C. (2015). Application of High Carbon Dioxide or Ozone Combined with MAP on Organic Late-Season Table Grapes Scarlotta Seedless®. *Acta Horticulturae* 1079:193–99.
- Di Renzo G.C., Altieri G., Genovese F., Tauriello A. (2015). Preliminary Results on the Effect of a Simultaneous CO<sub>2</sub>/Ethylene Treatment on Some Quality Properties of Persimmon Fruit. *Acta Horticulturae* 1071: 687-93.
- Condelli N., Caruso M.C., Galgano F., Russo D., Milella L., Favati F. (2015). Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. *Food Chemistry*, 177: 233-239.
- A. Tauriello, G.C. Di Renzo, G. Altieri, M.C. Strano, F. Genovese, e M. Calandra. (2015). Simulation of Cold Treatment during a Cargo Shipment of Citrus Fruit». *Acta Horticulturae* 1065: 1685–92.
- Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G.C. (2015). Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale». *Journal of Food Engineering*, 166: 325–34.
- Caruso Marisa Carmela, Galgano Fernanda, Tolve Roberta, Pecora Maria, Tedesco Idolo, Favati Fabio, Condelli Nicola (2016). Nutraceutical properties of wild berry fruits from Southern Italy. *Journal of Berry Research*, 6: 321-333.

- Altieri G., Genovese F., Admane N., Di Renzo G. C. (2016) On-line measure of donkey's milk properties by near infrared spectrometry». *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie* 69: 348–57.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. (2017). Aerobic Metabolism in the Genus *Lactobacillus*: Impact on Stress Response and Potential Applications in the Food Industry. *Journal of Applied Microbiology* 122 (4): 857–69.
- Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G. C. (2017) Models to improve the non-destructive analysis of persimmon fruit properties by VIS/NIR spectrometry. *Journal Of The Science Of Food and Agriculture* 97 5302–10.
- Matera A., Genovese F., Altieri G., Tauriello A., Di Renzo G.C. (2017). Effects on Must Quality Produced from Sangiovese and Cabernet Grape Frozen/Withered Using a Forced Air Plant. *Chemical Engineering Transactions* 58: 343–48.
- Matera A., Genovese F., Altieri G., Tauriello A., Di Renzo G.C. (2017). An Innovative Smart Device to Control Modified Atmosphere Packaging (MAP) of Fruit and Vegetables. *Chemical Engineering Transactions* 58 (2017): 193–98.
- Pascale R., Bianco G., Cataldi T.R.I., Buchicchio A., Losito I., Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G.C., Lafiosca M.C. (2018). Investigation of the Effects of Virgin Olive Oil Cleaning Systems on the Secoiridoid Aglycone Content Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of The American Oil Chemists' Society* 95: 665–71.

***Descrizione Università degli Studi di Foggia, Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente (SAFE-UNIFG ora Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimenti, Risorse Naturali e Ingegneria DAFNE-UNIFG)***

Il Dip. SAFE (ora DAFNE), ed in particolare il gruppo di lavoro coordinato dal Dott. Roberto ROMANIELLO, si occupa da anni dei problemi e degli sviluppi tecnologici connessi con il processo di estrazione olearia, rivisitando in toto tutto il processo di estrazione, dai metodi di frangitura al sistema di estrazione centrifuga. In particolare ha svolto ricerche su:

- Innovazione tecnologica e risvolti sulla qualità degli oli extravergini di oliva: ha condotto ricerche tese a rivisitare tutte le operazioni coinvolte nel processo di estrazione al fine di migliorare la qualità dell'olio e ottimizzando le prestazioni operative delle macchine e degli impianti di estrazione, anche nell'ottica della riduzione dei costi di produzione.
- Ottimizzazione di decanter di ultima generazione a risparmio di acqua (VDP): ha sviluppato lo studio dei sistemi centrifughi per estrazione olearia fino alla ottimizzazione dei decanter più innovativi, testandone le prestazioni funzionali su impianti industriali in scala reale.
- Studio e ottimizzazione di una nuova macchina per la frangitura delle olive, la denocciolatrice: lo studio è stato finalizzato alla prototipazione e messa a punto della macchina denocciolatrice nonché all'ottimizzazione delle prestazioni dell'intero impianto di estrazione, valutando anche gli effetti sulla qualità dell'olio e prestazionali sull'intero impianto di estrazione.

- Studi teorico-sperimentali per la messa a punto di una nuova gramola: è stata progettata e realizzata una nuova gramola cilindrica con scambiatore di calore sull'intera circonferenza della macchina e nuovo disegno dell'aspo di rimescolamento.
- Messa a punto di un mini impianto per l'estrazione olearia: ha condotto la messa a punto di un nuovo mini impianto di estrazione olearia con diverse alterative di processo, in linea con le esigenze della cosiddetta "filiera corta".
- Ricerche finalizzate alla definizione dei parametri di processo in funzione della qualità dell'olio: sono state sperimentate differenti condizioni di lavorazione intervenendo su parametri di gramolazione (tempo, temperatura, composizione dello spazio di testa) e parametri di estrazione (diversi valori di velocità differenziale tra coclea e tamburo e differenti diluizioni della pasta olearia).
- Influenza della composizione dello spazio di testa della gramola sulla qualità dell'olio e sulle prestazioni funzionali degli impianti di estrazione: sono stati condotti studi atti a valutare l'evoluzione della composizione dello spazio di testa durante la gramolazione nonché l'influenza di differenti atmosfere di gramolazione sulla qualità dell'olio.
- Progettazione realizzazione e messa a punto di un impianto di stoccaggio dell'olio con innovativo sistema di controllo della composizione dello spazio di testa.

Il Dipartimento SAFE dispone di due laboratori di macchine ed impianti per le industrie agroalimentari, attrezzato per svolgere prove di funzionalità di impianti agro-alimentari e tre laboratori di tecnologie alimentari presso i quali è possibile svolgere tutte le tipologie di analisi chimiche e fisiche sugli oli vergini di oliva.

Negli ultimi anni sono stati gestiti diversi progetti attinenti la tematica di ricerca che vengono di seguito richiamati:

- Progetto di ricerca Strategico PS059 – "Caratterizzazione e miglioramento qualitativo degli oli tipici pugliesi e riduzione dell'impatto ambientale" approvato con Delibera della Giunta Regione Puglia n. 1434 del 03 ottobre 2006 pubblicata sul BURP n. 130 del 11 ottobre 2006. Titolo attività: Messa a punto di sistema di stoccaggio dell'olio con controllo in linea dei parametri di processo.
- Progetto di ricerca PON0200186\_3417037 - PROINNO-BIT: Sviluppo di prodotti alimentari innovativi mediante soluzioni biotecnologiche, impiantistiche e tecnologiche. 2011-2015
- Progetto di ricerca PON02\_00186\_2866121 - ECO-P4: Promozione dei processi ECO\_Sostenibili per la valorizzazione delle produzioni agroalimentari pugliesi. 2011-2015
- Progetto di ricerca dal titolo: "Ecosostenibilità della filiera olivicolo-olearia in provincia di Foggia" finanziato dalla Fondazione Banca del Monte. 2012-2013
- Progetto di ricerca dal titolo: "Innovazione tecnologica nel ciclo di estrazione olearia" finanziato dalla Fondazione Caripuglia. 2012-2013
- Progetto di ricerca dal titolo: "L'utilizzo delle microonde nel processo di estrazione olearia (MICROLIO)" finanziato dalla Regione Puglia, PROGETTO DI RICERCA E SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA, avviso pubblico per l'invito a presentare proposte

progettuali di ricerca e sperimentazione in agricoltura (B.U.R.P. n. 59 del 02/05/2013) – art. 8. 2016 in corso di svolgimento.

- Progetto di ricerca dal titolo: "Indagine sulla presenza di microelementi ed antiossidanti ad elevata attività biologica in oli extravergini di oliva prodotti in provincia di Foggia", finanziato dalla Fondazione Banca del Monte. 2010-2011
- Progetto di ricerca dal titolo: "Commercial demonstration of megasonic technology for additional virgin olive oil recovery", finanziato dal Science and Industry Endowment Fund Experimental Development Program (EDP). 2018

Pubblicazioni più significative degli ultimi 5 anni (2013-2018):

- Giovenzana V., Beghi R., Romaniello R., Tamborrino A., Guidetti R., Leone A. (2018) Use of visible and near infrared spectroscopy with a view to on-line evaluation of oil content during olive processing. *Biosystems Engineering*, 172: 102-109.
- Leone A., Romaniello R., Tamborrino A., Urbani S., Servili M., Amarillo M., Grompone M.A., Gambaro A., Juliano P. (2018). Application Of Microwaves and Megasound to Olive Paste in an Industrial Olive Oil Extraction Plant: Impact on Virgin Olive Oil Quality and Composition European. *Journal of Lipid Science and Technology*, 120 (1), art. no. 1700261.
- Leone A., Romaniello R., Tamborrino A., Xu X.-Q., Juliano P. (2017). Microwave and megasonics combined technology for a continuous olive oil process with enhanced extractability. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 42: 56-63.
- Tamborrino A., Squeo G., Leone A., Paradiso V.M., Romaniello R., Summo C., Pasqualone A., Catalano P., Bianchi B., Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205: 34-46.
- Squeo, G., Tamborrino, A., Pasqualone, A., Leone, A., Paradiso, V.M., Summo, C., Caponio, F. (2017). Assessment of the Influence of the Decanter Set-up During Continuous Processing of Olives at Different Pigmentation Index . *Food and Bioprocess Technology*, 10: 592-602.
- Romaniello R., Leone A., Tamborrino A. (2017). Specification of a new de-stoner machine: evaluation of machining effects on olive paste's rheology and olive oil yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 115-121.
- Leone A., Esposito S., Tamborrino A., Romaniello R., Taticchi A., Urbani S., Servili M. (2016). Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118: 308-317.
- Romaniello R., Peri G., Leone A. (2016). Fluorescence hyper-spectral imaging to detecting faecal contamination on fresh tomatoes. *Journal of Agricultural Engineering*, 47: 7-11.

- Romaniello R., Leone A., Peri G. (2015). Measurement of food colour in L\*a\*b\* Units from RGB digital image using least squares support vector machine regression. *Journal of Agricultural Engineering*, 46: 138-143.
- Leone A., Romaniello R., Peri G, Tamborrino A. (2015). Development of a new model of olives de-stoner machine: Evaluation of electric consumption and kernel characterization". *Biomass and Bioenergy* 81: 108-116.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2015). Mathematical modelling of the performance parameters of a new decanter centrifuge generation. *Journal of Food Engineering*, 166: 10-20.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E., De Bellis,L., Tamborrino, A. (2015). Machining effects of different mechanical crushers on pit particle size and oil drop distribution in olive paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117: 1271-1279.
- Romaniello R., Zagaria R., Leone A., Tamborrino A., Scarascia Mugnozza,G. (2015). Automated control system for modified atmosphere in malaxer during olive oil extraction. *Acta Horticulturae*, 1071: 311-318.
- Leone A., Romaniello R., Tamborrino A., Catalano P., Peri G. (2015). Identification of vibration frequency, acceleration, and duration for efficient olive harvesting using a trunk shaker. *Transactions of the ASABE*, 58: 19-26.
- Tamborrino A., Leone A., Romaniello R., Catalano P., Bianchi B. (2015). Comparative experiments to assess the performance of an innovative horizontal centrifuge working in a continuous olive oil plant. *Biosystems Engineering*, 129: 160-168.
- Ayr U., Tamborrino A., Catalano P., Bianchi B., Leone A. (2015). "3D computational fluid dynamics simulation and experimental validation for prediction of heat transfer in a new malaxer machine. *Journal of Food Engineering*, 154: 30-38.
- Leone A., Romaniello R., Mangialardi G.I., Tamborrino A. (2015). Modified atmosphere in head space of extra virgin olive oil tanks: Testing a prototype integrated storage system. *Acta Horticulturae*, 1071: 319-326.
- Leone A., Tamborrino A., Zagaria R., Sabella E., Romaniello R. (2015). Plant innovation in the olive oil extraction process: A comparison of efficiency and energy consumption between microwave treatment and traditional malaxation of olive pastes. *Journal of Food Engineering*, 146: 44-52.
- Tamborrino A., Romaniello R., Zagaria R., LeoneA. (2014). Microwave-assisted treatment for continuous olive paste conditioning: Impact on olive oil quality and yield. *Biosystems Engineering*, 127: 92-102.
- Leone A., Tamborrino A., Zagaria R., Sabella E., Romaniello R. (2014). Plant innovation in the olive oil extraction process: A comparison of efficiency and energy consumption between microwave treatment and traditional malaxation of olive pastes. *Journal of Food Engineering*, 146:44-52.
- Leone A., Tamborrino A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E. (2014). Specification and implementation of a continuous microwave-assisted system for paste malaxation in an olive oil extraction plant. *Biosystems Engineering*, 125: 24-35.

- Tamborrino A., Pati S., Romaniello R., Quinto M., Zagaria R., Leone A. (2014). Design and implementation of an automatically controlled malaxer pilot plant equipped with an in-line oxygen injection system into the olive paste. *Journal of Food Engineering*, 141:1-12.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2014). Development of a prototype malaxer to investigate the influence of oxygen on extra-virgin olive oil quality and yield, to define a new design of machine. *Biosystem Engineering*, 118: 95–104.
- Tamborrino A., Catalano P., Leone A. (2014). Using an in-line rotating torque transducer to study the rheological aspects of malaxed olive paste. *Journal of Food Engineering*, 126: 65–71.



---

## The IT4NUEVOO Project

---

*Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

IT4NUEVOO Project WEBSITE: <https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/>

### State of the art

Extra-virgin olive oil (EVOO), extracted with an exclusively mechanical process, in addition to the composition of typical fatty acids, is characterized by a multitude of other compounds that confer the organoleptic, nutritional, healthy and stability properties that differentiate it from other vegetable oils and make it a fundamental component of the Mediterranean diet.

Generally, the concentration of these compounds in the oil is closely correlated with the cultivar of the olives used and with the environmental conditions of the production area. A decisive role to keep them in the extracted oil, or avoid their deterioration, is played by technology and production protocol. (Altieri et al., 2014, 2015).

The flowchart of the mechanical extraction process of EVOO includes three essential steps: a) the preparation of the olive paste (crushing/crushing and kneading); b) the separation of the oil into a solid phase (pomace) and a liquid phase known as oily must (oil and vegetable water); (c) the final separation of the liquid phase into oil and waste water.

Thus, EVOO is obtained through a seemingly simple process, consisting of a few processing steps that, in rapid succession, lead to the finished product. However, incorrect management of process parameters and production protocol can have dramatic repercussions on the final quality of the oil produced. For this reason, for several years many researches have been carried out in order to improve the EVOO extraction process with the development of new machines or technologies (Leone et al., 2015; Romaniello et al., 2017), with the optimization of times and temperatures of milling, kneading and composition of the atmosphere in the headspace during kneading (Leone et al., 2014, 2015; Tamborrino et al., 2014a).

Several studies have allowed to highlight the importance of the construction characteristics of the decanters and the related operating parameters, in relation to the rheological and chemical-physical characteristics of the olive pastes, strictly dependent on the relationship between solid phase and liquid phases (water and oil) (Tamborrino et al., 2017, 2014b).

It is now known that to maximize the quality and yield, an accurate and constant control of the process parameters is required to adapt them to the characteristics of the olive pastes to be extracted (Altieri, 2010). This control is important because the pastes have a high variability of the physical-mechanical characteristics from one year to the next, during the same season and, sometimes, even on the same day due to the different cultivars to which the processed drupes belong, the water content of the plant tissues, the climatic trend and the degree of ripeness.

The multiple theoretical-applicative studies on the sizing / operation of the decanter, aimed at improving the quanti-qualitative performance during the extraction of EVOO, have seen a strong integration among the production sector, plant manufacturers and researchers and have allowed to

reach the definition of new concept decanters (Tamborrino et al., 2015). These decanters are able to produce an oily must with a significantly reduced water content compared to the past and a high quality of EVOO, without excessively penalizing extraction yields. With these decanters the produced oily must has a low content of water and suspended solids, and is less "difficult" to treat in the final separation water / oil.

Therefore, the possibility of using a "less aggressive" separation with respect to centrifugation, based on sedimentation, has been studied, in order to separate from the oily must a percentage of oil of the highest quality (up to 90%), with characteristics comparable to those of the oil contained in the olives of origin, while the residual oil in the must is separated with the traditional centrifugal disc separator (Altieri et al., 2014).

The centrifugal disc separator is an extremely efficient and effective machine, since the centrifugal field, created inside the drum with the high number of revolutions, allows the final cleaning of the oil to be excellently carried out. Although the maintenance required for this device, mainly linked to the operation of the automatic discharge of solids, represents in some cases a non-negligible production problem.

However, due to the high speed of rotation speed, the action developed by the discs results in a mechanical action on the treated fluid "excessive" as it determines a heating and an intimate mixing of the oil with the ambient air, resulting in a high diffusion of oxygen into product, which is one of the causes of oxidative reactions and loss of numerous valuable compounds present in the original product. Several scientific works have highlighted this loss of quality and the excessive solubilization of oxygen in the extracted oil, due to the passage in the cleaning centrifuge used to eliminate the residual water and impurities still present after extraction. (Pascale et al., 2018)

These changes due to the "production process" are in stark contrast to the current and increasing consumer attention to the commercial quality of EVOO, with a concept of genuineness linking the product consumed to the olives of origin. This idea is part of a consumer market context that appreciates "cloudy oils", i.e. oils that are particularly green and rich in aromas, unfiltered and with stable turbidity.

The separation of the oil/water suspension by natural decantation (sedimentation) is unsuitable for modern industrial processes due to the lack of control and the excessive time required, with negative repercussions on the organization of the production process and on the quality of the oil produced. However, sedimentation represents a great opportunity to reduce production costs and improve the quality of EVOO, if it can be controlled and managed properly.

In this context, in the MAC-Lab laboratory (<https://machimplab.wordpress.com/>) of the SAFE of the University of Basilicata, a new system for cleaning and final separation of water / oil, called Rotased, was developed, which was preliminarily designed through 3D fluid dynamic modeling and subsequently built and tested in preliminary tests at various oil mills.

The project will also evaluate the effect of strains belonging to the species of *L. plantarum* and *L. pentosus* on olives, before and after harvesting, to control deterioration due to the presence of yeasts and preserve the properties and quality of olive oil. Lactic acid bacteria have long been recognized as important members of the microbiota of fermented table olives due to their ability to reduce pH, control deteriorating microorganisms and hydrolyze oleuropein.

The strains belonging to the species of the *Lactobacillus plantarum* group (*L. plantarum*, *L. pentosus*) are among the microorganisms that colonize the surfaces of olives and play a fundamental role during fermentation (Hurtado et al., 2012) thanks to the ability to tolerate the high content of

phenols, as well as to degrade them, albeit slowly (Rodriguez et al., 2008a, 2008b, Landete et al., 2008; Esteban-Torres et al., 2013).

Recently, the role of microorganisms in the quality and deterioration of extra virgin olive oil has also been recognized. Yeasts are considered the main components of the microbiota of olives and olive oil during processing and storage (Ciafardini and Zullo, 2018), and several species have been involved in deterioration processes.

Strains of *L. plantarum*, on the contrary, are able to improve the quality of olive oil, degrading bitter compounds and reducing oxidative phenomena thanks to antioxidant activity (Kachouri and Hamdi, 2004, 2006; Kachouri et al., 2015; Sherani et al., 2018).

Furthermore, some strains are able to perform an aerobic and respiratory metabolism through the activity of the enzyme pyruvate oxidase and the synthesis of an electron transport chain in the presence of heme and menaquinone cofactors (Parente et al., 2010; Guidone et al., 2013; Zotta et al., 2017). Oxygen-tolerant and respiratory phenotypes of *L. plantarum* have an increased ability to degrade reactive oxygen species (ROS; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, free radicals) thanks to the synthesis of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, heme-dependent catalase; Li et al., 2012; Zotta et al., 2013).

The improvement of the nutritional characteristics of oils obtained with innovative plants and technologies, reaching a hydroxytyrosol content of at least 250 mg / kg of oil, can be exploited to allow the use of a label that shows a health claim such as "olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress" (claim authorized by EFSA - Reg. 1924/2006). It must also be accompanied by the phrase "The beneficial effect is obtained with a daily intake of 20 g of olive oil".

- Altieri G., (2010). Comparative trials and an empirical model to assess throughput indices in olive oil extraction by decanter centrifuge. *Journal of Food Engineering*, 97: 46-56.
- Altieri G., Di Renzo G.C., Genovese F., Tauriello A., D'Auria M., Racioppi R., Viggiani L., (2014). Olive oil quality improvement using a natural sedimentation plant at industrial scale. *Biosystem Engineering*, 122(6): 99-114.
- Altieri G., Genovese F., Tauriello, A., & Di Renzo, G. C. (2015). Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 166, 325–334.
- Ciafardini, G., . Zullo B.A. (2018). Virgin Olive Oil Yeasts: a Review. *Food Microbiology* 70: 245–53. doi:10.1016/j.fm.2017.10.010.
- Guidone A, Ianniello R. G. Ricciardi A., Zotta T. , Parente E. (2013). Aerobic Metabolism and Oxidative Stress Tolerance in the *Lactobacillus Plantarum* Group. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (9).
- Esteban-Torres M., Reverón I. , Mancheño J.M., de las Rivas B., Muñoz R. (2013). Characterization of the First Feruloyl Esterase From *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.01523-13.
- Hurtado A., Reguant C., Bordons A., Rozès N. (2012). Lactic Acid Bacteria From Fermented Table Olives. *Food Microbiology* 31 (1): 1-8.
- Kachouri Faten, Hamdi M.. (2004). Enhancement of Polyphenols in Olive Oil by Contact with Fermented Olive Mill Wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry* 39 (7): 841–45.

- Kachouri F., Hamdi M. (2006). Use *Lactobacillus plantarum* in Olive Oil Process and Improvement of Phenolic Compounds Content. *Journal of Food Engineering* 77 (3): 746–52.
- Kachouri F., Ksontini H., Kraiem M., Sett K., Mechmeche M., Hamdi M.. (2015). Involvement of Antioxidant Activity of *Lactobacillus Plantarum* on Functional Properties of Olive Phenolic Compounds. *Journal of Food Science and Technology* (Mysore) 52 (12). Springer India: 7924–33.
- Landete J. M., Curiel J.A , Rodriguez H., de las Rivas B., Munoz R. 2008. Study of the Inhibitory Activity of Phenolic Compounds Found in Olive Products and Their Degradation by *Lactobacillus plantarum* Strains." *Food Chemistry* 107 (1): 320–26.
- Pascale R. , Bianco G. , Cataldi T. R., Buchicchio A., Losito I., Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G.C., Lafiosca M.C. (2018). Investigation of the Effects of Virgin Olive Oil Cleaning Systems on the Secoiridoid Aglycone Content Using High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95: 665-671.
- Rodríguez H., Landete J.M., Curiel J.A., de las Rivas B., Mancheño J.M., Muñoz R. (2008°). Characterization of the P-Coumaric Acid Decarboxylase From *Lactobacillus plantarum* CECT 748T." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (9): 3068–72.
- Rodriguez H., Landete JM ,Rivas B , Munoz R. (2008b). Metabolism of Food Phenolic Acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry* 107 (4): 1393–98.
- Zotta, T., Ianniello R.G , Guidone A., Parente E., Ricciardi A. (2013). Selection of Mutants Tolerant of Oxidative Stress From Respiratory Cultures of *Lactobacillus plantarum* C17. *Journal of Applied Microbiology* 116 (3): 632–43.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. (2017). Aerobic Metabolism in the Genus *Lactobacillus*: Impact on Stress Response and Potential Applications in the Food Industry. *Journal of Applied Microbiology* 122 (4): 857–69.
- Tamborrino A., Squeo G., Leone A., Paradiso V.M., Romaniello R., Summo C., Pasqualone A., Catalano P., Bianchi B., Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205: 34-46.
- Romaniello R., Leone A., Tamborrino A. (2017). Specification of a new de-stoner machine: evaluation of machining effects on olive paste's rheology and olive oil yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 115-121.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2015). Mathematical modelling of the performance parameters of a new decanter centrifuge generation. *Journal of Food Engineering*, 166: 10-20.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E., De Bellis,L., Tamborrino, A. (2015). Machining effects of different mechanical crushers on pit particle size and oil drop distribution in olive paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117: 1271-1279.
- Tamborrino A., Leone A., Romaniello R., Catalano P., Bianchi B. (2015). Comparative experiments to assess the performance of an innovative horizontal centrifuge working in a continuous olive oil plant. *Biosystems Engineering*, 129: 160-168.
- Tamborrino A., Pati S., Romaniello R., Quinto M., Zagaria R., Leone A. (2014a). Design and implementation of an automatically controlled malaxer pilot plant equipped with an in-line oxygen injection system into the olive paste. *Journal of Food Engineering*, 141:1-12.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2014). Development of a prototype malaxer to investigate the influence of oxygen on extra-virgin olive oil quality and yield, to define a new design of machine. *Biosystem Engineering*, 118: 95–104.

- Tamborrino A., Catalano P., Leone A. (2014b). Using an in-line rotating torque transducer to study the rheological aspects of malaxed olive paste. *Journal of Food Engineering*, 126: 65–71.

### **Framing in the objectives of the sector**

The proposed project aims to optimize the existing extraction process in order to improve the extraction yields of fat and antioxidant substances present in the olive drupes.

The industrial research and experimental development of the ITI4NUEVOO project are aimed at the development of a new food product called NUEVOO and the development of a production protocol that integrates the production cycle with new machines to improve the extraction of polyphenolic compounds.

Considering this, the ITI4NUEVOO project is perfectly consistent with what is already foreseen by the National Strategy of Smart Specialization with the aim of creating and stimulating an environment favorable to the development of relevant projects that allow to apply and enhance knowledge in the field of scientific research and technological innovation.

In addition, the project is also in line with the Strategic Plan for innovation and research in the agricultural sector, drawn up by the Ministry of Agricultural, Food and Forestry Policies, is particularly consistent with some of the thematic AREAS considered priority and in particular is part of AREA 4 concerning the "Quality and typicality of agricultural products, food safety and healthy lifestyles" grafting into the line of activity b) "Improvement, protection and traceability of quality and distinctiveness and adaptation of the relevant certification standards".

In addition, in general, the project also responds to a whole series of objectives indicated in thematic areas 1, 3, 4 and 6 as explained below.

#### ***- AREA 1. Sustainable increase in productivity, profitability and resource efficiency in agri-ecosystems***

The extraction of bioactive compounds allows to pursue various objectives envisaged by Area 1 and specifically the sustainable use of nutrients and the optimization of production processes through an improvement in production and its profitability as well as the reduction of waste and the more efficient use of agri-food resources.

#### ***- AREA 3. Coordination and integration of supply chain processes and strengthening the role of agriculture***

The project proposal is also in line with the objectives of area 3 as it involves the use of low-impact technologies for the extraction of bioactive compounds (extraction, separation, concentration, etc.) without the use of adjuvants and / or solvents but nevertheless revalorizing primary production waste. The development of new products with direct effects on the integration of the processes of the processing chain is also planned.

***- AREA 4. Quality and typicality of agricultural products, food safety and healthy lifestyles***

The planned activities allow to reduce food waste and to enhance their reuse and are aimed at the production of innovative functional foods for human nutrition, with specific nutritional characteristics, more responsive to current market demands and adaptation of the related certification standards.

***- AREA 6. Development and reorganization of the knowledge system***

Activities are planned to promote the transfer of knowledge and innovation with methods that favor and facilitate the adoption of innovation within the business context.

In addition, the proposed project is in line with the Community guidelines laid down in REGULATION (EU) NO 1305/2013 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 December 2013 outlining the objectives and priorities for support for rural development. In fact, the project is in line with the objectives of stimulating the competitiveness of the agricultural sector; to ensure the sustainable management of agricultural and natural resources and climate action; to achieve balanced territorial development of rural economies and communities, including the creation and maintenance of jobs.

Finally, the project promotes knowledge transfer and innovation in the agricultural sector and rural areas; supports the enhancement of farm viability and competitiveness in all its forms by promoting innovative technologies for farms; It makes it possible to preserve, restore and enhance ecosystems related to agriculture, in particular by promoting better management/enhancement of production.

**Project Summary**

The general objective of this project is to optimize the existing extraction process in order to improve the extraction yields of fat and antioxidant substances present in the drupes, with the development of a new protocol based on innovative plants and fermentation techniques that allow to increase the level of hydroxytyrosol and its derivatives (e.g. oleuropein + tyrosol) reaching a hydroxytyrosol content of at least 250 mg / kg of oil in order to use on the label the claim authorized by EFSA (Reg. 1924/2006) "olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative stress". In fact, this claim can only be used if the EVOO contains at least 5mg of hydroxytyrosol and its derivatives per 20 g of olive oil (250 mg / 1000 g). Of course, for consumption it is necessary that the minimum daily consumption is indicated on the label, equal to: "daily intake of 20 g of olive oil".

The project is divided into four Work-Packages (WPs) with their sub-articulations.

***WP1 COORDINATION***

under which the assurance of the correct implementation of the project (initiation, execution and closure of the project) will be envisaged; compliance with contractual obligations, work plan and budget; the effective management of positive and effective working practices to be shared among all partners.

### ***WP2 DEFINITION OF PLANT ENGINEERING FOR THE PRODUCTION OF NUEVOO***

within which it will be: 1) Reorganized the layout of the oil extraction plants by introducing new technologies for the conditioning of olive paste. In particular, an ultrasonic system will be implemented in an oil extraction plant and tested in industrial level productions to improve the treatment of olive pastes in order to increase the oil extraction yield and the content of compounds with high health value (e.g. phenolic substances); 2) Developed a new water-oil separation system to be interposed between the decanter and the centrifugal disc separator, in order to safeguard EVOO from oxidation and to create the optimal conditions to maximize the extraction of hydroxytyrosol and its derivatives, comparing the EVOO extracted in the traditional way with the NUEVOO extracted from olives / olive pastes inoculated with Lactobacilli.

### ***WP3 ENHANCEMENT FOR NUTRACEUTICAL PURPOSES OF NUEVOO***

in which the possibility of using starter cultures of lactic acid bacteria, belonging to the species *Lactobacillus plantarum* and *L. pentosus*, isolated from olives and oil extracts, will be evaluated for the enhancement of the nutraceutical and nutritional properties of EVOO. The impact of the innovations introduced on the quality of the oil and its nutraceutical properties will be evaluated through a combination of chemical, physical and sensory analyses: a chemical and sensory evaluation and oxidative stability of the experimental oils obtained and compared with those obtained conventionally. An estimate of the shelf-life will also be carried out (by prediction and evaluation of samples at times other than production). Indications will also be provided relating to the enhancement of NUEVOO not only for direct consumption, but in combination with other products to make condiments / sauces and complex foods.

### ***WP4 PLAN FOR THE EXPLOITATION OF RESULTS, IMPACT AND DISSEMINATION OF RESULTS***

This phase will be articulated in training events for operators in the sector and dissemination to the scientific community and operators in the sector at national and international level of the results and knowledge acquired through the research project.

The Lines of Activity for the different WPs are as follows.

#### ***WP1***

Regular meetings and organization of meetings. In addition, the compilation of physical and financial monitoring forms of the project with the implementation of an online management procedure is planned.

#### ***WP2***

Evaluation of an ultrasonic plant for the conditioning of olive pastes by means of comparative tests, up to the definition of a protocol of use and the design, construction and patent of an oil/water/sludge separator to improve the final quality of EVOO. Development of a new water-oil separation system to be interposed between the decanter and the centrifugal disc separator, in order to safeguard EVOO from oxidation and to create optimal conditions to maximize the extraction of hydroxytyrosol and its derivatives.

**WP3**

Isolation from olives and extracts of oils of lactic acid bacteria. Screening for their antioxidant capacity and tolerate polyphenols and ability to degrade phenols. Technological and taxonomic characterization of the selected strains to be used as starter cultures for the production of oils and extracts, with nutraceutical properties. Inoculation of olives (pre and post-harvest) with lactobacilli strains for the control of deterioration and to improve the properties of olive oil. Production of oils and extracts obtained with the traditional and innovative system, with and without inoculation of additional lactic acid bacteria cultures. Evaluation of the products obtained through a chemical characterization, with particular reference, in addition to the quality parameters established by current legislation, to phenolic and vitamin substances and antioxidant activity, in order to verify the effectiveness of the impact of the technology applied on the nutraceutical value of the oil. The oxidative stability of the experimental oils, compared with those conventionally produced, will also be evaluated, as well as the shelf-life (by prediction and evaluation of samples at times other than production). The quantitative descriptive sensory analysis and evaluation of the satisfaction of new foods formulated with high added value will also be carried out.

**WP4**

Organization of seminars for the specific dissemination of project results at oil mills ("Field day"); the definition of intermediate forms of dissemination (press releases, popular magazines, workshops and seminars; the preparation of scientific, technical and popular publications of the partial and overall results of the activities carried out in the corresponding areas of national and international scientific interest. Participation in national and international conferences of researchers of the different OUs. Use of the results for the development of teaching materials in the context of training courses in the field and teaching in relevant degree courses. Realization of video and / or video lessons for the dissemination on the network of the methodological approach and the results achieved.

Taking into account the partnership of the two research institutions that, at the Italian level, present the greatest experience in research on olive oil extraction techniques, the expected results of the project are:

- the design and implementation of an innovative protocol to produce a new extra virgin olive oil (NUE-VOO) with better quality (i.e. an enhanced antioxidant content) and a very high sensory taste based on innovative technologies and systems;
- the creation of a new product the "NUEVOO" with high nutritional and nutraceutical value and the development of a production protocol that could become the reference for the multitude of micro, small and medium mills present in the country.

Therefore, the ambition of this project is the production of a new food product called NUEVOO, with nutraceutical properties that could be used for the preparation of sauces or condiments or cooking.

As far as quality and health properties are concerned, the goal is to obtain an EVOO with characteristics that make it so different from traditional EVOO and other vegetable oils or fats, that it can be considered new and therefore called NUEVOO.

Considering that the high content of healthy compounds could increase bitterness or may be unpleasant to the taste, to create another commercialization opportunity for olive oil producers the project will explore the possibility of producing innovative nutraceutical products based on NUEVOO such as salad dressings and sauces.

The other ambition of the NUEVOO project is to develop a production protocol that integrates the production cycle with new machines to improve the extraction of polyphenolic compounds.

As products of the research, it is planned the realization of:

- n. 1 NUEVOO (new type of extra virgin olive oil) with a polyphenol content 50% higher than the EVOO normally produced and the pleasant and balanced taste.
- n. 1 nutraceutical product (Italian dressing and mayonnaise high in antioxidants);
- n.1 innovative kneading project different from others existing on the market. Able to work in modified atmosphere (MA), rotating blades and internal surface capable of producing a high abrasive action on the paste, equipped with an ultrasonic extraction system.
- n.1 innovative oil/water/solid separator project based on a gentle separation of water and oil (IMS). From a commercial point of view, today there is great interest in olive oil of minimal processing because, considered by the consumer closer, as regards the composition, to the original oil present in the olive, therefore the use of centrifugal separators with vertical discs interferes with the final oil with respect to the quality perceived by consumers. A fluid dynamic study of the IMS apparatus will also be conducted to optimize and adapt the rotation speed to the characteristics of the oily wort measured by in-line sensors (such as oil content, water content, turbidity, etc.).
- n. 1 EVOO extraction protocol for the production of NUEVOO based on the results of previous research on crushing / grinding operation and extraction integrated with the results / machines / innovative technological strategies for the extraction of EVOO for the production of NUEVOO, obtained from this research proposal.

### **Predictable obstacles**

- Difficulty in the extraction of antioxidant compounds. This obstacle will be removed by providing a test protocol articulated on two different strategies: the protection of the antioxidants present avoiding any type of operation that could determine a reduction or decay of the same. It is intended to refer to: the elimination of the addition of mains water during the different extraction phases; improvement of the mechanical action on the cellular structure of the pulp of the drupe to improve the escape of antioxidant substances; microbial action to modify the pH of the vegetable water solution present to allow greater solubilization.

- The variability of the raw material. For the tests, large producers will be involved able to supply homogeneous batches of olives, for the different varieties. Consider that the research will be carried out between Puglia and Basilicata and that the collaboration relationships with olive producing companies are already rooted.
- Resistance of oil producers to produce NUEVOO. This represents one of the main obstacles to the project, since producing a new type of oil is not easy in a market characterized by high competition at national and international level and in which the quality factors that contribute to the definition of the price are still the traditional ones. However, the proponents of the project have been collaborating for years with "enlightened" producers who are aware of having to improve the nutritional characteristics of the product in order to appear on the market of more profitable prices than the current ones and to be able to extend the consumption of EVOO to new markets.
- The level of training of production operators is not up to the technologies proposed by the project. The corrective action for this obstacle passes through the assistance that the highly qualified staff of the two operating units will give to the staff of the oil mills that will be involved in the experimentation. In this way it will be possible to correctly apply the protocol and train the personnel assigned to the production line. The training will then be completed with the events foreseen in the communication actions.

### **Effects and benefits of the Project**

Every EVOO producer is aware that the quality of the oil produced plays a key role in the strategy to encourage new consumption opportunities and face the challenges of a global market. However, at present in all producing countries the amount of poor-quality VOO is significantly higher than EVOO.

From the context analysis it is evident that the company size of the oil mills (micro and small SMEs) makes it very difficult or impossible to invest in research to develop technologies, extraction protocols or new products. Oil mills operate only 1 - 2 months / year, so they cannot afford the costs of research and development of new technologies customized according to specific industrial needs and very far from the research carried out in the laboratory. On the other hand, the consumer requires a high-quality product with health and possibly nutraceutical characteristics.

For this reason, in many different studies and projects carried out to develop and verify how the single operation and the technological parameter / technique affect the oil extraction rate and, in some cases, the quality of olive oil is not enough.

In fact, all reported results are influenced by high variability, as many authors report, due to many external factors.

Therefore, the link between the individual technological operations / parameters with quality and health properties are, until now, labile and not well defined due to uncontrolled factors.

Starting from the previous considerations and the opportunities offered by the call, the project will give the following benefits:

- optimization of the existing extraction process with manageable and sustainable technological development;
- development of a new type of extra virgin olive oil with nutraceutical and healthy properties (i.e. an enhanced antioxidant content) and a very high sensory taste;
- development of a specific extraction protocol (EP) that could become the reference for the multitude of micro, small and medium OMs;
- strengthening the image of EVOO as a healthy product and increasing consumption;
- development of new modifications/machines able to enhance the characteristics of the oil produced (new kneading machine, new technological approach, new separation system);
- development of a microbiological treatment protocol of the oil to increase its nutritional characteristics; development of new products such as NUEVOO-based sauces/condiments.

## **Project Units**

### ***Description of University of Basilicata – School of Agricultural Sciences SAFE***

The SAFE research groups involved have highly qualified infrastructure and personnel for the execution of research and development activities in the field of Food Science and Technology. In fact, the wealth of scientific equipment and pilot plants associated with a working group with a strong interdisciplinary connotation and with a great experience in the laboratory and operational on production plants, makes the SAFE research structure an excellence in research in the food sector at national and international level.

In particular, the skills are available to address, with innovative methodologies, both the study of fundamental biochemical processes and the technical aspects related to the definition and evaluation of processes for food production, for the evaluation of the suitability of raw materials and abiotic production factors in food processing, production of functional foods, sensory evaluation of food, verification of the possible presence of substances affecting the safety of food products, technological and biotechnological production processes for high quality products linked to the Italian food tradition, conservation and conditioning in the agri-food industries, development of sustainable production processes, the choice, development and construction of machines, plants and instrumentation, also for automation, specifically dedicated to the food industry.

In particular, there are 3 macro-research groups, each of which contributes with specific infrastructures and equipment and a spin-off company (Ninetek Innovazioni per l'agro-industria srl), which represents the operational arm for technology transfer and prototyping.

The project involves the collaboration of 3 research groups belonging to the School of Agricultural Sciences of the University of Basilicata:

- the Plants and Automation Group (Prof. Giovanni Carlo Di Renzo, Prof. Giuseppe Altieri, Dr. Francesco Genovese)
- the Industrial Microbiology Group (Prof. Annamaria Ricciardi)

- the Food Technology Group (Prof. Fernanda Galgano, Dr. Marisa Carmela Caruso)

The research and development and design structures belonging to the groups will be involved in the project, with the support staff belonging to them and with both standard and particularly important equipment in use within them available to achieve the project objectives.

The 3 Research Groups have laboratories equipped with modern equipment for basic and applied research, as well as a pilot plant for oil extraction and various other pilot plants for dairy production.

The Microbiology Laboratory has the following units (laboratories): Industrial Microbiology; Multifunctional; Physiology of microorganisms (bacteria section).

The Plant and Automation Laboratory has the following units (laboratories): Physical-mechanical properties of food. Pilot plants for oil extraction. Pilot plants for dairy production.

The Food Technology Laboratory has the following units (laboratories): Food chemistry; Sensory analysis; Lab. Analytical of Food Technologies; Food packaging; Supercritical fluids.

Over the years they have participated in numerous regional and national projects, consolidating collaborative relationships with companies in the agri-food sector for the development of innovative processes and products.

Over the years, several projects related to the research theme have been managed and are mentioned below:

- PRIN 2004 Valorizzazione dell' "origine" nell'ambito della filiera olivicola: ruolo del territorio, della certificazione e della tracciabilità in funzione della sicurezza alimentare e dell'internazionalizzazione dei mercati. (OLIOAUTENTICO)
- PRIN-2008 Analisi, comprensione e sfruttamento della diversità e della regolazione della risposta allo stress in *Lactobacillus plantarum*
- Progetto Baby Cresci Sano (BCS) – ricerca industriale e sviluppo sperimentale di alimenti destinati all'infanzia, a base oleosa, arricchiti con vitamine liposolubili (A, E, D, K) e B6 resa liposolubile”, convenzione di ricerca con AREA Science Park Trieste- (2010-2011)
- Progetto OLIVA INFORNATA – ricerca industriale e sviluppo sperimentale per l'ottimizzazione del processo produttivo e di conservazione dell'oliva infornata”, convenzione di ricerca con AREA Science Park Trieste. 2010-2012.
- Progetto Ministeriale FIRB-2010 Futuro in Ricerca “Basi genetiche e fisiologiche del metabolismo aerobio in *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*: aspetti di base e applicative” (2011-2013).
- N. 2 Convenzioni di Ricerca Ditta Sacco s.r.l – Scuola SAFE nell'ambito del Progetto il progetto Profsicuri 2 (Prodotti Freschi: Sistemi innovativi per garantire serbevolezza, sicurezza, identità e qualità dalla produzione al consumo), domanda DM29187 del 31/03/2006 (2013-2014)
- Convenzione di Ricerca Ditta Basso Fedele e Figli s.r.l – Scuola SAFE nell'ambito del Progetto il progetto Profsicuri 2 (Prodotti Freschi: Sistemi innovativi per garantire

serbevolezza, sicurezza, identità e qualità dalla produzione al consumo), domanda DM29187 del 31/03/2006 (2013-2014)

- Progetto EUFOLIA Mediterranea "Valutazione della qualità chimico-fisica degli oli provenienti da olivi condotti secondo le tecnologie colturali a basso impatto" . Bando misura 124 - PSR Basilicata 2007 - 2013. (2013-2015)
- Progetto Regionale PIF - Improvement of agro-food production of Basilicata Region: cheese, olive oil, wine, pasta and fresh fruit and vegetables (2014-2015).
- Consulenza per il progetto Horizon 2020 – IoF2020 n.731884 attualmente è in corso dallo 01/01/2017 in corso;
- Progetto Horizon 2020 - MyPack n.774265 per il quale allo stato attuale è in corso la firma del Project Agreement.

Below are the most significant publications of the last 5 years (2013-2018).

- Zotta T., Ianniello R.G., Guidone A., Parente E., Ricciardi, A. (2013). Selection of mutants tolerant of oxidative stress from respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 632-643.
- Zotta T., Ianniello R.G., Guidone A., Parente E., Ricciardi A. (2013). Selection of Mutants Tolerant of Oxidative Stress From Respiratory Cultures of *Lactobacillus plantarum* C17." *Journal of Applied Microbiology*, 116 (3): 632–43
- Altieri G., Di Renzo G.C., Genovese F., Tauriello A., D'auria M., Racioppi R., Viggiani F. (2014). Olive oil quality improvement using a natural sedimentation plant at industrial scale». *Biosystems Engineering* 122: 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.04.007>.
- Guidone A., Zotta T., Ross R.P., Stanton C., Rea M.C., Parente,E., Ricciardi A. (2014). Functional properties of *Lactobacillus plantarum*: a multivariate screening study. *LTW-Food Science and Technology*, 56: 69-76.
- Ricciardi A., Parente E., Tramutola A., Guidone A., Ianniello R.G., Pavlidis D., Tsakalidou E., Zotta T. (2014). Evaluation of a differential medium for the preliminary identification of members of the *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* groups, *Annals of Microbiology*, 65: 1649-1658.
- Ricciardi A., Castiglione Morelli M.A., Ianniello R.G., Parente E., Zotta T. (2014). Metabolic profiling and stress response of anaerobic and respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17 grown in a chemically defined medium. *Annals of Microbiology*, 65: 1639-1648.
- Ricciardi, A., Ianniello, R.G., Parente, E., Zotta, T. (2015). Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/jam.12894.
- Caruso M.C., Galgano F., Pecora M., Tolve R., Verrastro M., Favati F. (2015). Improvement of Analytical Methods for the Determination of Polyphenolic Bioactive Compounds in Berry Fruits. *Journal of Chemistry*.

- Genovese F., Altieri G., Di Renzo G. C. (2015). Anaerobic digestion potential to reduce livestock waste environmental impact: a case study in Basilicata region (Italy). In *New trends in the ecological and biological research*, 47–47. Presov - SVK: University of Presov, 2015.
- Admane N., Verrastro V., Altieri G., Genovese F., Tarricone L., Ippolito A., Di Renzo G. C. (2015). Application of High Carbon Dioxide or Ozone Combined with MAP on Organic Late-Season Table Grapes Scarlotta Seedless®. *Acta Horticulturae* 1079:193–99.
- Di Renzo G.C. , Altieri G., Genovese F., Tauriello A. (2015). Preliminary Results on the Effect of a Simultaneous CO<sub>2</sub>/Ethylene Treatment on Some Quality Properties of Persimmon Fruit. *Acta Horticulturae* 1071: 687-93.
- Condelli N., Caruso M.C., Galgano F., Russo D., Milella L., Favati F. (2015). Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. *Food Chemistry*, 177: 233-239.
- A. Tauriello, G.C. Di Renzo, G. Altieri, M.C. Strano, F. Genovese, e M. Calandra. (2015). Simulation of Cold Treatment during a Cargo Shipment of Citrus Fruit». *Acta Horticulturae* 1065: 1685–92.
- Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G.C.. (2015). Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale». *Journal of Food Engineering*, 166: 325–34.
- Caruso Marisa Carmela, Galgano Fernanda, Tolve Roberta, Pecora Maria, Tedesco Idolo, Favati Fabio, Condelli Nicola (2016). Nutraceutical properties of wild berry fruits from Southern Italy. *Journal of Berry Research*, 6: 321-333.
- Altieri G., Genovese F., Admane N., Di Renzo G. C. (2016) On-line measure of donkey's milk properties by near infrared spectrometry». *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie* 69: 348–57.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. (2017). Aerobic Metabolism in the Genus *Lactobacillus*: Impact on Stress Response and Potential Applications in the Food Industry. *Journal of Applied Microbiology* 122 (4): 857–69.
- Altieri G., Genovese F., Tauriello A., E Di Renzo G. C. (2017) Models to improve the non-destructive analysis of persimmon fruit properties by VIS/NIR spectrometry. *Journal Of The Science Of Food and Agriculture* 97 5302–10.
- Matera A., Genovese F., Altieri G., Tauriello A., Di Renzo G.C. (2017). Effects on Must Quality Produced from Sangiovese and Cabernet Grape Frozen/Withered Using a Forced Air Plant. *Chemical Engineering Transactions* 58: 343–48.
- Matera A., Genovese F., Altieri G., Tauriello A., Di Renzo G.C. (2017). An Innovative Smart Device to Control Modified Atmosphere Packaging (MAP) of Fruit and Vegetables. *Chemical Engineering Transactions* 58 (2017): 193–98.
- Pascale R., Bianco G., Cataldi T.R.I., Buchicchio A., Losito I., Altieri G., Genovese F., Tauriello A., Di Renzo G.C., Lafiosca M.C. (2018). Investigation of the Effects of Virgin Olive Oil Cleaning Systems on the Secoiridoid Aglycone Content Using High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of The American Oil Chemists' Society* 95: 665–71.

*Description of the University of Foggia, Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences (SAFE-UNIFG now Department of Agricultural Sciences, Food, Natural Resources and Engineering DAFNE-UNIFG)*

The Dept. SAFE (now DAFNE), and in particular the working group coordinated by Dr. Roberto ROMANIELLO, has been dealing for years with the problems and technological developments associated with the oil extraction process, revisiting in full the entire extraction process, from crushing methods to the centrifugal extraction system. In particular, he has carried out research on:

- Technological innovation and implications on the quality of extra virgin olive oils: it has conducted research aimed at revisiting all the operations involved in the extraction process in order to improve the quality of the oil and optimizing the operational performance of the machines and extraction plants, also with a view to reducing production costs.
- Optimization of the latest generation water-saving decanters (VDP): it has developed the study of centrifugal systems for oil extraction up to the optimization of the most innovative decanters, testing their functional performance on full-scale industrial plants.
- Study and optimization of a new machine for pressing olives, the pitting machine: the study was aimed at prototyping and tuning the pitting machine as well as optimizing the performance of the entire extraction plant, also evaluating the effects on oil quality and performance on the entire extraction plant.
- Theoretical-experimental studies for the development of a new kneading machine: a new cylindrical kneading machine with heat exchanger on the entire circumference of the machine and new design of the mixing reel has been designed and built.
- Development of a mini plant for oil extraction: led the development of a new mini oil extraction plant with various process alternatives, in line with the needs of the so-called "short supply chain".
- Research aimed at defining the process parameters according to the quality of the oil: different processing conditions have been tested by intervening on kneading parameters (time, temperature, composition of the head space) and extraction parameters (different values of differential speed between auger and drum and different dilutions of the oil paste).
- Influence of the composition of the kneading head space on the quality of the oil and on the functional performance of the extraction plants: studies have been conducted to evaluate the evolution of the composition of the headspace during kneading as well as the influence of different kneading atmospheres on the quality of the oil.
- Design, construction and development of an oil storage system with innovative control system of the composition of the head space.

The SAFE Department has two laboratories of machines and plants for the agri-food industries, equipped to carry out functional tests of agri-food plants and three food technology laboratories where it is possible to carry out all types of chemical and physical analyzes on virgin olive oils.

In recent years, several projects related to the research theme have been managed and are mentioned below:

- Progetto di ricerca Strategico PS059 – “Caratterizzazione e miglioramento qualitativo degli oli tipici pugliesi e riduzione dell’impatto ambientale” approvato con Delibera della Giunta Regione Puglia n. 1434 del 03 ottobre 2006 pubblicata sul BURP n. 130 del 11 ottobre 2006. Titolo attività: Messa a punto di sistema di stoccaggio dell’olio con controllo in linea dei parametri di processo.
- Progetto di ricerca PON0200186\_3417037 - PROINNO-BIT: Sviluppo di prodotti alimentari innovativi mediante soluzioni biotecnologiche, impiantistiche e tecnologiche. 2011-2015
- Progetto di ricerca PON02\_00186\_2866121 - ECO-P4: Promozione dei processi ECO\_Sostenibili per la valorizzazione delle produzioni agroalimentari pugliesi. 2011-2015
- Progetto di ricerca dal titolo: “Ecosostenibilità della filiera olivicolo-olearia in provincia di Foggia” finanziato dalla Fondazione Banca del Monte. 2012-2013
- Progetto di ricerca dal titolo: “Innovazione tecnologica nel ciclo di estrazione olearia” finanziato dalla Fondazione Caripuglia. 2012-2013
- Progetto di ricerca dal titolo: “L’utilizzo delle microonde nel processo di estrazione olearia (MICROLIO)” finanziato dalla Regione Puglia, PROGETTO DI RICERCA E SPERIMENTAZIONE IN AGRICOLTURA, avviso pubblico per l’invito a presentare proposte progettuali di ricerca e sperimentazione in agricoltura (B.U.R.P. n. 59 del 02/05/2013) – art. 8. 2016 in corso di svolgimento.
- Progetto di ricerca dal titolo: “Indagine sulla presenza di microelementi ed antiossidanti ad elevata attività biologica in oli extravergini di oliva prodotti in provincia di Foggia”, finanziato dalla Fondazione Banca del Monte. 2010-2011
- Progetto di ricerca dal titolo: “Commercial demonstration of megasonic technology for additional virgin olive oil recovery”, finanziato dal Science and Industry Endowment Fund Experimental Development Program (EDP). 2018

Most significant publications of the last 5 years (2013-2018):

- Giovenzana V., Beghi R., Romaniello R., Tamborrino A., Guidetti R., Leone A. (2018) Use of visible and near infrared spectroscopy with a view to on-line evaluation of oil content during olive processing. *Biosystems Engineering*, 172: 102-109.
- Leone A., Romaniello R., Tamborrino A., Urbani S., Servili M., Amarillo M., Grompone M.A., Gambaro A., Juliano P. (2018). Application Of Microwaves and Megasound to Olive Paste in an Industrial Olive Oil Extraction Plant: Impact on Virgin Olive Oil Quality and Composition *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120 (1), art. no. 1700261.

- Leone A., Romaniello R., Tamborrino A., Xu X.-Q., Juliano P. (2017). Microwave and megasonics combined technology for a continuous olive oil process with enhanced extractability. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 42: 56-63.
- Tamborrino A., Squeo G., Leone A., Paradiso V.M., Romaniello R., Summo C., Pasqualone A., Catalano P., Bianchi B., Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205: 34-46.
- Squeo, G., Tamborrino, A., Pasqualone, A., Leone, A., Paradiso, V.M., Summo, C., Caponio, F. (2017). Assessment of the Influence of the Decanter Set-up During Continuous Processing of Olives at Different Pigmentation Index . *Food and Bioprocess Technology*, 10: 592-602.
- Romaniello R., Leone A., Tamborrino A. (2017). Specification of a new de-stoner machine: evaluation of machining effects on olive paste's rheology and olive oil yield and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97: 115-121.
- Leone A., Esposto S., Tamborrino A., Romaniello R., Taticchi A., Urbani S., Servili M. (2016). Using a tubular heat exchanger to improve the conditioning process of the olive paste: Evaluation of yield and olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118: 308-317.
- Romaniello R., Peri G., Leone A. (2016). Fluorescence hyper-spectral imaging to detecting faecal contamination on fresh tomatoes. *Journal of Agricultural Engineering*, 47: 7-11.
- Romaniello R., Leone A., Peri G. (2015). Measurement of food colour in L\*a\*b\* Units from RGB digital image using least squares support vector machine regression. *Journal of Agricultural Engineering*, 46: 138-143.
- Leone A., Romaniello R., Peri G, Tamborrino A. (2015). Development of a new model of olives de-stoner machine: Evaluation of electric consumption and kernel characterization". *Biomass and Bioenergy* 81: 108-116.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2015). Mathematical modelling of the performance parameters of a new decanter centrifuge generation. *Journal of Food Engineering*, 166: 10-20.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E., De Bellis,L., Tamborrino, A. (2015). Machining effects of different mechanical crushers on pit particle size and oil drop distribution in olive paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117: 1271-1279.
- Romaniello R., Zagaria R., Leone A., Tamborrino A., Scarascia Mugnozza,G. (2015). Automated control system for modified atmosphere in malaxer during olive oil extraction. *Acta Horticulturae*, 1071: 311-318.
- Leone A., Romaniello R., Tamborrino A., Catalano P., Peri G. (2015). Identification of vibration frequency, acceleration, and duration for efficient olive harvesting using a trunk shaker. *Transactions of the ASABE*, 58: 19-26.

- Tamborrino A., Leone A., Romaniello R., Catalano P., Bianchi B. (2015). Comparative experiments to assess the performance of an innovative horizontal centrifuge working in a continuous olive oil plant. *Biosystems Engineering*, 129: 160-168.
- Ayr U., Tamborrino A., Catalano P., Bianchi B., Leone A. (2015). "3D computational fluid dynamics simulation and experimental validation for prediction of heat transfer in a new malaxer machine. *Journal of Food Engineering*, 154: 30-38.
- Leone A., Romaniello R., Mangialardi G.I., Tamborrino A. (2015). Modified atmosphere in head space of extra virgin olive oil tanks: Testing a prototype integrated storage system. *Acta Horticulturae*, 1071: 319-326.
- Leone A., Tamborrino A., Zagaria R., Sabella E., Romaniello R. (2015). Plant innovation in the olive oil extraction process: A comparison of efficiency and energy consumption between microwave treatment and traditional malaxation of olive pastes. *Journal of Food Engineering*, 146: 44-52.
- Tamborrino A., Romaniello R., Zagaria R., Leone A. (2014). Microwave-assisted treatment for continuous olive paste conditioning: Impact on olive oil quality and yield. *Biosystems Engineering*, 127: 92-102.
- Leone A., Tamborrino A., Zagaria R., Sabella E., Romaniello R. (2014). Plant innovation in the olive oil extraction process: A comparison of efficiency and energy consumption between microwave treatment and traditional malaxation of olive pastes. *Journal of Food Engineering*, 146:44-52.
- Leone A., Tamborrino A., Romaniello R., Zagaria R., Sabella E. (2014). Specification and implementation of a continuous microwave-assisted system for paste malaxation in an olive oil extraction plant. *Biosystems Engineering*, 125: 24-35.
- Tamborrino A., Pati S., Romaniello R., Quinto M., Zagaria R., Leone A. (2014). Design and implementation of an automatically controlled malaxer pilot plant equipped with an in-line oxygen injection system into the olive paste. *Journal of Food Engineering*, 141:1-12.
- Leone A., Romaniello R., Zagaria R., Tamborrino A. (2014). Development of a prototype malaxer to investigate the influence of oxygen on extra-virgin olive oil quality and yield, to define a new design of machine. *Biosystem Engineering*, 118: 95–104.
- Tamborrino A., Catalano P., Leone A. (2014). Using an in-line rotating torque transducer to study the rheological aspects of malaxed olive paste. *Journal of Food Engineering*, 126: 65–71.

---

## Ricordo del prof. Paolo Amirante – Professore Emerito di Meccanica Agraria – Università degli Studi di Bari

---

*Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

**L'insegnamento del Prof. Paolo Amirante: le Macchine e Impianti per le Industrie Agro-alimentari**



Il prof. Paolo Amirante, professore emerito di Meccanica Agraria dell'Università di Bari (1937-2022), è stato ingegnere meccanico e docente universitario.

### **50 anni di didattica e di ricerca nell'ambito delle discipline AGR/09 (Meccanica Agraria)**

*“È stato un docente di meccanica agraria presso l'Università di Bari, in un periodo storico in cui l'Ateneo barese esprimeva docenti di altissima levatura e valore scientifico. Ha contribuito a dare un volto di modernità al settore estrattivo degli oli da olive. Recentemente era stato nominato emerito dell'Accademia dei Georgofili.”* (<https://www.olioofficina.it/magazine/economia/mondo/la-scomparsa-del-professor-paolo-amirante.htm>)

Il prof. Paolo Amirante, laureato in ingegneria meccanica all'università di Napoli nell'AA 1961-62 con il massimo dei voti e la lode, conseguendo un premio di laurea per il quale svolse la sua prima attività professionale nello stabilimento Olivetti di Pozzuoli, progettando cinematismi e stampi per calcolatrici meccaniche, inizia la carriera universitaria nel 1963 quando viene chiamato a Bari dal prof. Giovanni Candura per ricoprire il posto di assistente ordinario e quindi aiuto alla cattedra di Meccanica Agraria della Facoltà di Agraria dell'Università di Bari.

Sotto la guida del prof. Giovanni Candura prima e del prof. Gino Dipaola poi svolge attività di ricerca affrontando i problemi emergenti di quell'epoca, ottimizzazione delle lavorazioni principali del terreno, macchine per l'irrigazione, macchine per la raccolta integrale e agevolata dei prodotti ortofrutticoli per il consumo fresco e da industria.

Nei primi anni '70 inizia ad avvicinarsi al mondo dell'enologia e della produzione dell'olio d'oliva, che sono in grande fermento in quell'epoca e, soprattutto, presentano una forte carenza di competenze scientifiche che possano supportarne lo sviluppo. La mancanza di un percorso formativo con forte caratterizzazione ingegneristica nel settore alimentare rende il settore agro-

industriale debole dal punto di vista strutturale e culturale. Pertanto, in accordo con il suo maestro Dipaola, ha l'illuminazione di spostarsi dalla Meccanica Agraria tradizionale alle Macchine e Impianti, e nel 1975 viene chiamato in ruolo prima come professore straordinario e poi, nel 1978, come ordinario della Cattedra di Macchine e Impianti di Industrie Agroalimentari presso la Facoltà di Agraria dell'Università di Bari.

La fase iniziale della sua attività è complessa, perché si tratta di ricerca applicata che richiede una rete di relazioni molto solida; fare prove sperimentali impone uno stretto rapporto con le imprese che operano nel settore e i costruttori di macchine e impianti. Il prof. Amirante, con la sua grande capacità di intessere relazioni e soprattutto di mantenerle, raggiunge l'obiettivo di esplorare e colonizzare il mondo delle industrie agroalimentari, maturando esperienza e acquisendo conoscenze utili ai fini di una didattica di livello universitario.

Pertanto, è indiscutibile che ha creato un nuovo profilo di ricercatore e docente universitario nel settore della Meccanica Agraria, che è stato preso a modello da tante sedi universitarie.

Come tutte le persone illuminate, consapevole dei propri limiti culturali, ha ritenuto necessario contaminare il proprio sapere con quello di tanti altri, sia colleghi di settori scientifico-disciplinari diversi dalla Meccanica Agraria e sia di esperti dell'industria.

Il laboratorio di Macchine e Impianti, diventa un vero e proprio incubatore d'idee e di attività, collaborano agronomi, tecnologi, chimici agrari e industriali, ingegneri, informatici, fisici, biologi, per dare più forza e trasferibilità alle ricerche svolte.

In breve il Prof. Amirante diventa un riferimento sui temi di impiantistica per tanti colleghi e operatori del settore alimentare, con particolare riferimento a quello oleario e ortofrutticolo.

Un suo grande cruccio era che questa contaminazione di competenze, che potremmo oggi definire interdisciplinarietà della ricerca, da alcuni non è stata riconosciuta come una qualità, in quanto ritenuta molto distante dalla Meccanica Agraria tradizionale.

Un piccolo cenno ai ruoli che ha ricoperto: è stato membro del Consiglio Direttivo dell'Associazione Italiana di Ingegneria Agraria (A.I.I.A.), Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale dell'Olio e dell'olio di Spoleto e Accademico Ordinario dell'Accademia Nazionale di Agricoltura e dell'Accademia dei Georgofili. Si accingeva ad andare a Firenze per ricevere la nomina ad accademico emerito.

Dal 1978 al 1987 è stato direttore dell'Istituto di Meccanica Agraria dell'Università degli Studi di Bari e dal 2000 al 2005 è stato direttore del Dipartimento PRO.GE.SA dell'Università degli Studi di Bari.

È stato responsabile scientifico di numerosi Progetti Scientifici ed autore di oltre 300 pubblicazioni.

Tra le tante attività che ha svolto, proprio perché a mio avviso sono quelle che più gli stavano a cuore, voglio ricordare:

- i suoi studi e ricerche sugli impianti per il trattamento e smaltimento le acque di vegetazione prodotte nei frantoi oleari;

- le ricerche svolte per il miglioramento della qualità dell'olio d'oliva pugliese e salentino in particolare, diffondendo le buone pratiche per la raccolta meccanizzata delle olive, le macchine per l'estrazione olearia e la conservazione del prodotto ottenuto. I suoi studi sulla gramola e sul decanter hanno portato enormi benefici nel settore dell'olio d'oliva, consentendo un miglioramento della qualità del prodotto ottenuto.

Inoltre, va ricordato che il Prof. Paolo Amirante è stato, nella comunità scientifica italiana, uno dei pionieri della ricerca nel settore post-raccolta. Ricordo ancora gli animati confronti con il prof. Fausto Gorini ai tempi del progetto Frutticoltura I dell'allora MAF.

Il suo contributo all'impiantistica applicata alla conservazione refrigerata dei prodotti ortofrutticoli ed all'abbattimento rapido del calore di campo rappresenta una pietra miliare nello sviluppo delle filiere dell'ortofrutta e in particolare dell'uva da tavola e delle ciliegie.

Del prof. Paolo Amirante a noi, che siamo stati suoi allievi, mancano:

- il suo garbo, insomma il suo essere un "signore" prima che un professore;
- la curiosità nei confronti delle mie attività scientifiche e gestionali, il suo desiderio di partecipare al mio percorso professionale e la sua gioia nel sentirsi riconoscere il merito di avermi avviato alla carriera universitaria. Credo che abbia avuto lo stesso atteggiamento con tutti noi che siamo stati suoi allievi;
- la sua ironia e la naturale allegria, con cui ha affrontato tutta la sua esistenza, incluso quest'ultimo periodo di isolamento.

Concludo dicendo che mi ha lasciato la consapevolezza che l'approccio multidisciplinare e il continuo confronto con gli operatori del settore sono indispensabili per una ricerca di qualità nell'ambito delle Macchine e Impianti per le Industrie Agroalimentari, quindi, io continuerò a trasmettere questo suo messaggio, e per me sarà un modo per onorare i suoi insegnamenti e il suo ricordo.

Prof. Giovanni Carlo Di Renzo



---

## In memory of prof. Paolo Amirante – Professor Emeritus of Agricultural Mechanics – University of Bari

---

*Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

### The teaching of Prof. Paolo Amirante: Machines and Plants for Agri-Food Industries



Prof. Paolo Amirante, full professor, emeritus of Agricultural Mechanics at the University of Bari (1937-2022), was a mechanical engineer and professor.

### 50 years of teaching and research in the field of AGR/09 (Agricultural Mechanics)

*"He was a professor of agricultural mechanics at the University of Bari, in a historical period in which the University of Bari expressed professors of the highest relevance and scientific value. It has contributed to give a modern approach to the olive oil extraction sector. He had recently been selected as emeritus of the Accademia dei Georgofili. "*

(<https://www.olioofficina.it/magazine/economia/mondo/la-scomparsa-del-professor-paolo-amirante.htm>)

Prof. Paolo Amirante, graduated in mechanical engineering at the University of Naples in the AA 1961-62 with honours, obtaining a degree award and carrying out his first professional activity in the Olivetti plant in Pozzuoli, designing kinematics and moulds for mechanical calculators, began his university career in 1963 when he was called to Bari by prof. Giovanni Candura to hold the position of ordinary assistant and subsequently assistant to the chair of Agricultural Mechanics of the Faculty of Agriculture of the University of Bari.

Under the guidance of prof. Giovanni Candura first and of prof. Gino Dipaola after, he carries out research activities addressing the emerging problems of that period, as optimization of the main tillage operations, irrigation machines, machines for the full and assisted harvesting of fruit and vegetables for both the fresh consumption and as industrial product.

In the early 70s he began to approach the world of oenology and olive oil production, which were in great turmoil at that time and, above all, presented a strong lack of scientific skills that could support its development. The lack of a training course with strong engineering characterization in the food sector makes the agri-industrial sector weak from a structural and cultural point of view.

Therefore, in agreement with his teacher Dipaola, he has the enlightenment to move from traditional Agricultural Mechanics to Machines and Plants, and in 1975 he was called first to the role as extraordinary full professor and subsequently, in 1978, as full professor of the Chair of Machines and Plants of Agri-Food Industries at the Faculty of Agriculture of the University of Bari.

The initial phase of his activity is complex, because it concerns the applied research requiring a very strong network of relationships; indeed, to carry out experimental tests requires a close relationship with companies operating in the sector and manufacturers of machines and plants. Prof. Amirante, with his great ability to weave relationships and, above all, to maintain them, achieves the goal of exploring and colonizing the world of agri-food industries, gaining experience and acquiring useful knowledge for the purposes of teaching at university level.

Therefore, it is unquestionable that he has created a new profile of researcher and university professor in the field of Agricultural Mechanics, which has been taken as a model by many universities.

Like all enlightened people, aware of their cultural limits, he considered to be necessary to link his knowledge with that of many other colleagues from scientific fields other than Agricultural Mechanics and to experts of the industry.

The laboratory of Machines and Plants, becomes a real incubator of ideas and activities, collaborating with agronomists, technologists, agricultural and industrial chemists, engineers, computer scientists, physicists, biologists, to give more strength and transferability to the researches carried out.

In short, the prof. Amirante becomes a reference on the plant engineering issues for many colleagues and operators in the food sector, with particular reference to the olive oil and fruit and vegetable industry.

One of his great concerns was that this linking of skills, which we could now define as interdisciplinary research, had not been recognized by some colleagues as a quality, as it was considered very distant from traditional Agricultural Mechanics.

A small mention on the roles he has held: he was a member of the Board of Directors of the Italian Association of Agricultural Engineering (A.I.I.A.), Ordinary Academician of the National Academy of Olive and Oil of Spoleto and Ordinary Academician of the National Academy of Agriculture and the Academy of Georgofili. He was about to go to Florence to receive the appointment as academic emeritus.

From 1978 to 1987 he was director of the Institute of Agricultural Mechanics of the University of Bari and from 2000 to 2005 he was director of the PRO.GE.SA Department of the University of Bari.

He has been scientific director of many Scientific Projects and author of over 300 publications.

Among the many activities he has carried out, as in my opinion they are the ones that most interested him, I want to remember:

- his studies and researches on the plants for the treatment and disposal of vegetable water produced in oil mills;
- the researches carried out for the improvement of the quality of olive oil from Puglia and Salento in particular, spreading good practices for the mechanized harvesting of olives, machines for the oil extraction and the storage of the obtained product. His studies on the kneading machine and decanter have brought enormous benefits in the olive oil extraction sector, allowing an improvement in the quality of the obtained product.

Furthermore, it should be remembered that prof. Paolo Amirante was, in the Italian scientific community, one of the pioneers of the researches in the post-harvest field. I still remember the animated discussions with prof. Fausto Gorini at the time of the Frutticoltura I project.

His contribution to the plant engineering applied to the refrigerated storage of fruit and vegetables and to the rapid abatement of field heat represents a milestone in the development of fruit and vegetable supply chains and in particular with regard to table grapes and cherries.

The qualities of prof. Paolo Amirante that we miss:

- his politeness, in short, his being a "gentleman" before his being a professor;
- the curiosity towards my scientific and management activities, his desire to participate in my professional path and his joy in being recognized for having started me on a university career. I think he had the same attitude towards all of us who were his students;
- his irony and natural cheerfulness, with which he faced his entire existence, including this last period.

I want conclude by saying that he left me the awareness that the multidisciplinary approach and the continuous discussion with the operators of the industry are indispensable for a research of quality in the field of Machines and Plants for the Agri-Food Industries, therefore, I will continue to disseminate this message, and for me it will be a way to honour his teachings and his memory.

Prof. Giovanni Carlo Di Renzo



---

## Il Progetto IT4NUEVOO: relazione intermedia del Coordinatore

---

*Giovanni Carlo Di Renzo (Coordinatore Scientifico del Progetto)*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

Il progetto IT4NUEVOO (D.M. N. 30311 del 31/10/2018 e D.M. di concessione n. 18235/7110/2019 del 24/09/2019) terminerà il 30/11/2022.

### Relazione di monitoraggio intermedia

#### *Attività WP1 - Coordinamento*

#### *Attività WP4 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati*

Nel mese di febbraio 2019 è iniziata la fase di progettazione e costruzione del sito web del progetto. È stato quindi deciso di utilizzare lo strumento Google Sites per predisporre la struttura del sito e per caricare tutti i relativi documenti informativi.

Il sito web viene correntemente utilizzato per divulgare le attività ed i risultati del progetto.

Il sito è attualmente disponibile al seguente indirizzo web:

<https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/>

Per l'avanzamento delle varie attività del progetto è prevista un'apposita sezione.

(<https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivit%C3%A0-del-progetto>)

Preliminarmente, è stato organizzato un incontro di tutti i partner per la presentazione dell'inizio del progetto (Kick-off Meeting: Impianti e tecnologie innovative per l'estrazione di un nuovo olio extravergine d'oliva nutraceutico e con elevato contenuto di sostanze salutari <https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivit%C3%A0-del-progetto/avvio-a1m01>).

L'incontro si è svolto presso l'aula A1 dell'Università degli Studi della Basilicata in data 10/06/2019 a cui hanno partecipato studenti e docenti dell'UNIBAS come anche imprenditori del mondo imprenditoriale ed in particolare del settore della produzione dell'olio di oliva.

Ci sono stati interventi e presentazioni sia da parte dei rappresentanti istituzionali (Assessore all'Agricoltura della Regione Basilicata) sia da parte delle singole unità operative che collaborano al progetto.

In particolare gli interventi hanno riguardato:

- Impianti innovativi per la separazione olio/acqua e miglioramento della qualità di oli extravergini di oliva (G.C. Direnzo, G. Altieri e F. Genovese)

(<https://drive.google.com/file/d/1LsftRiM924yxVlQlqY08gpjLV5QKZmVl/view?usp=sharing>)

- Innovazione tecnologica e qualità degli oli extravergini di oliva (A. Leone, R. Romaniello e A. Tamborrino)

(<https://drive.google.com/file/d/1SHE3Np5wJzv1wMN5WHV0zMiTtQlhEBte/view?usp=sharing>)

- Effetto di batteri lattici sulla qualità di olive e olio extravergine di oliva (A. Ricciardi e T. Zotta)

(<https://drive.google.com/file/d/1YJ9rzoQZGPLXKxsYg5KUtZZKf6eXNvuO/view?usp=sharing>)

- Valutazioni chimiche e sensoriali in oli extravergini di oliva convenzionali ed innovativi (F. Galgano, M.C. Caruso e N. Condelli)

(<https://drive.google.com/file/d/1e9-lxLxD0GSrWlXKn4H5v-xBKYVho3HT/view?usp=sharing>)

È stata messa a punto la procedura per la gestione on-line dell'avanzamento fisico e finanziario del progetto. La procedura utilizza un Google Drive condiviso fra i vari partner del progetto che consente, tramite un'opportuna gestione degli accessi, la lettura di tutti i documenti a tutti i partner coinvolti. La scrittura, e quindi l'immissione dei documenti specifici richiesti nelle varie tappe temporali, è suddivisa per azioni, per cui ciascun partner può inserire i documenti solo nella cartella relativa alla sua attività specifica. L'accesso è riservato solo ai componenti delle U.O. del progetto.

Il 17/09/2019 si è svolta una riunione di coordinamento per la definizione dei protocolli di prova e di analisi, nel corso della medesima riunione sono stati identificati i frantoi dove verranno eseguite le prove sperimentali. ([https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivita%20del-progetto?%23h.p\\_1pNg9GDdw0\\_U#h.p\\_1pNg9GDdw0\\_U](https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivita%20del-progetto?%23h.p_1pNg9GDdw0_U#h.p_1pNg9GDdw0_U))

Il 04/11/2020 si è svolto un incontro di coordinamento a distanza delle varie unità operative. È stato fatto il punto della situazione delle varie attività e sono state esposte le attività già svolte. Inoltre, è stata descritta l'impostazione delle nuove prove sperimentali che verranno svolte.

### ***Attività WP2.1 (gruppo Meccanica Agraria - UNIFG- al 30/11/2020)***

Le attività dell'unità operativa dell'Università di Foggia (dip. DAFNE, ex SAFE), alla data del 30/11/2020, hanno avuto come oggetto lo sviluppo dei punti del WP2.1.1 (Scelta di idoneo impianto ad ultrasuoni) e WP2.1.2. (Prove comparative di estrazione olearia).

#### ***WP2.1.1***

Nella fase iniziale del progetto, è stato eseguito uno screening per definire l'utilizzo di una idonea macchina ad ultrasuoni da utilizzare in un impianto di estrazione olearia. La scelta è ricaduta su una macchina in grado di processare paste di olive a portate in massa fino a 5000 kg/h. La prima fase ha riguardato la messa a punto della macchina in modo da predisporla per il collegamento rapido ad una linea di estrazione pre-esistente. La macchina è stata dotata di flange DIN e di sistemi di controllo della pressione e della temperatura della pasta di olive in transito. Riguardo alle

funzionalità operative della macchina, sono stati eseguiti test per stabilire i limiti di pressione in ingresso della pasta di olive e i parametri del trasduttore per trasmettere gli ultrasuoni alla pasta di olive.

La trasmissione degli ultrasuoni alla pasta di olive è stata garantita da un sonotrodo cilindrico inserito in una tubazione in acciaio, con sezioni di ingresso e uscita della pasta di olive. Inizialmente è stata utilizzato un sonotrodo a geometria semplice, successivamente sostituito da un sonotrodo a geometria complessa, in modo da aumentare la superficie di contatto tra esso e la pasta di olive.

Il sistema di controllo della macchina, costituito da un PLC, ha permesso di interfacciare il sonotrodo con un booster, controllandone in funzionamento e le soglie operative, garantendo il distacco dell'alimentazione in caso di sovra-assorbimento elettrico (eccedente 3.500 W per più di 5 secondi). Tramite il touch-screen del PLC è stato possibile controllare in tempo reale, l'assorbimento elettrico, la pressione di esercizio, la frequenza e l'ampiezza della vibrazione del sonotrodo. Le condizioni di lavoro della macchina sono state impostate in modo da conferire alla pasta di olive una energia specifica di circa 15 kJ/kg.

#### **WP2.1.2**

Le prove di funzionalità della macchina sono state condotte in un impianto di estrazione olearia, presso l'azienda "Oleificio Cericola s.r.l." – Incoronata (FG). L'impianto ha una portata oraria di 5000 kg/h ed è composto da: 1. Deramifogliatrice; 2. Lavatrice; 3. Frangi-denocciolatore parziale (modello Moliden-Leone); gruppo gramole (6 unità); 4. Centrifuga orizzontale e 3 uscite; 5. centrifuga verticale.

La macchina ad ultrasuoni è stata installata in due punti differenti dell'impianto di estrazione: a) tra il frangi-denocciolatore e il gruppo gramole; b) tra il gruppo gramole e la centrifuga orizzontale. In questo modo si è indagato sull'effetto degli ultrasuoni in fase pre e post gramolazione. Le prove comparative sono state pianificate utilizzando lotti omogenei di olive, Cultivar Coratina. Sono state eseguite estrazioni senza (testi di controllo) e con l'utilizzo della macchina ad ultrasuoni (pre e post gramolazione).

La verifica della funzionalità della macchina è stata eseguita valutando le prestazioni quantitative dell'impianto di estrazione. A tal fine, sono stati prelevati campionamenti di olive, pasta di olive, sansa esausta ed acqua di vegetazione. Sono stati determinati, quindi i parametri quantitativi utili a definire le prestazioni dell'impianto: contenuto medio di olio nelle olive; contenuto di olio residuo nella sansa; contenuto di olio residuo nell'acqua di vegetazione. Tramite il bilancio di massa eseguito su ogni prova di estrazione è stato calcolare il valore di estraibilità, ovvero il rapporto tra la quantità di olio estratto e la quantità di olio effettivamente contenuto nelle olive.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un effetto statisticamente significativo della macchina ad ultrasuoni, riguardo le prestazioni quantitative dell'impianto ad una portata in massa di 3000 kg/h, nella configurazione che ha previsto la macchina ad ultrasuoni posizionata a monte delle macchine gramolatrici.

Le prove sperimentali sono in corso di esecuzione anche nella presente campagna olearia, 2020/2021, con modifiche alla macchina in modo da poter lavorare a portate orarie maggiori di 3000 kg/h.

#### SPESE SOSTENUTE

- Spesa di personale a contratto (assegno di ricerca) per un importo pari a € 25.500,00.

#### *Attività WP 2.2 (gruppo di Meccanica Agraria - UNIBAS- al 30/11/2020) - Progettazione, costruzione e brevetto di un separatore olio/acqua/morchia per migliorare la qualità finale di EVOO.*

Sono stati identificati i due frantoi oleari dove sono state eseguite le prove sperimentali: Frantoio Oleario Ruscigno C.da Santa Teresa, SNC, Tricarico (MT); Masseria Curtimaggio C.da Curtimaggio, 9, Grottaglie (TA).

Sono state svolte le prove sperimentali di confronto nei due frantoi oleari a Grottaglie (TA) e Tricarico (MT) utilizzando le cv. Cima di Melfi, Coratina e Leccino.

È stato valutato l'utilizzo del prototipo sperimentale (ROTASED) per la separazione liquido-liquido con l'obiettivo di definire i criteri progettuali per la realizzazione di un prototipo di impianto per la separazione dell'olio di oliva dal mosto oleoso in uscita dal decanter, al fine di eliminare gran parte dell'acqua residua senza ricorrere al separatore centrifugo; quest'ultimo, infatti, influisce negativamente sulla qualità dell'olio di oliva, determinandone la perdita di "corpo" a causa dell'elevata ossigenazione.

Sono stati valutati i dati delle analisi chimico-fisiche e spettrofotometriche di confronto sui campioni raccolti durante le prove sperimentali. In particolare è stata considerata: l'Analisi Colorimetrica (olive), l'Analisi Turbidimetrica (olio), le Determinazioni spettrofotometriche Vis e NIR in cuvette di quarzo da 10mm (olio), la Determinazione spettrofotometrica VIS con sfera integratrice in capsula Petri (pasta gramolata e sansa), il Contenuto in acqua, residuo secco e residuo grasso (Sansa).

I dati sperimentali ottenuti con l'innovativo separatore Rotased, utilizzato per la pulizia finale del mosto oleoso prima del suo successivo imbottigliamento, evidenziano l'efficacia dello stesso nella pulizia dell'olio e la possibilità di sostituire i tradizionali separatori centrifughi ad asse verticale che vengono normalmente utilizzati nella fase di pulizia finale dell'olio. Tuttavia, a differenza di questi ultimi, il Rotased evita un'eccessiva ossigenazione e genera un minor riscaldamento dell'olio, originati dalle macchine in fase di separazione. Inoltre, il Rotased conserva le più importanti proprietà sensoriali e nutrizionali di un olio Extra-Vergine d'oliva. Complessivamente, le evidenze raccolte rappresentano una base di partenza per l'allestimento dell'impianto da utilizzare a livello industriale per la produzione di un olio extravergine di oliva "torbido". Dall'osservazione dei dati ottenuti si può notare come i parametri chimici, di tutti i campioni oggetto dello studio, rientrano nei limiti di legge stabiliti per la categoria degli Oli Extra-Vergini di Oliva.

Anche a seguito dei risultati ottenuti in queste prove, il Rotased ha ricevuto l'attestazione di brevetto per invenzione industriale dal Ministero dello Sviluppo Economico – Ufficio Italiano Brevetti in data 28/01/2019 con il numero 102016000078140.

Per il numero di perossidi le concentrazioni medie nei campioni trattati con Rotased (Sedoil) e con la centrifuga tradizionale (Cenoil) è risultato essere rispettivamente: 10,41 e 12,01 mEqO<sub>2</sub>/kg per la Cv. Cima di Melfi; 8,55 e 8,15 mEqO<sub>2</sub>/kg per la Cv. Coratina; 6,59 e 7,39 mEqO<sub>2</sub>/kg per la Cv. Leccino. Questi risultati confermano il profondo contatto olio-aria (ossigeno) che si verifica durante l'operazione di centrifugazione, rappresentando una fonte importante di innesco dei processi ossidativi.

Per quanto riguarda invece il contenuto in polifenoli, i campioni di Cenoil hanno mostrato un valore inferiore di tale parametro rispetto al Sedoil (per la sola Cv. Coratina e su tutte e tre le differenti velocità di rotazione centrifuga). Questo risultato conferma l'azione ossidante prodotta dall'operazione di pulitura eseguita durante il passaggio nel separatore centrifugo verticale.

È stata condotta una simulazione fluido-dinamica del funzionamento del prototipo stesso utilizzando OpenFoam, un software open-source per la simulazione fluidodinamica e multifisica. Si è eseguita la simulazione di un flusso 2D incomprimibile bifase, con rotazione e forza di gravità. Si è utilizzato un modello di turbolenza di tipo k-epsilon SST che ben si presta a descrivere regimi fluttuanti da laminare a turbolenti, anche se i casi test d'interesse sono laminari. In particolare sono privilegiati i funzionamenti in regime laminare per evitare rimescolamenti tra le fasi, e per avere una ottimale separazione delle stesse. Il flusso bifase è risolto attraverso un modello VOF (Volume Of Fluid). Esso caratterizza il flusso bifase attraverso le equazioni di Navier-Stokes scritte per la miscela, e risolvendo una nuova equazione per la frazione di volume (alpha) che descrive il grado di presenza delle due fasi in un determinato volumetto.

La simulazione fluido-dinamica ha mostrato e chiarito come un aumento della portata generi differenti regimi di flusso all'interno della centrifuga, ma non riesce da solo a rendere selettivi i due outlet per le due differenti fasi.

Come attività integrativa, è stata studiata e messa a punto, tramite script di Matlab, la correlazione spettrofotometrica sulla sansa e sull'olio, determinata per 3 parametri ritenuti importanti nella gestione del decanter centrifugo per l'estrazione olearia: il residuo grasso sul secco; il residuo grasso sull'umido; il contenuto di acqua nella sansa. È stato utilizzato il metodo forward stepwise regression che ha permesso di selezionare un numero piccolo di lunghezze d'onda, cosa che renderà possibile la costruzione di uno strumento portatile a filtri discreti oppure a diodi LED tarati esattamente sulle lunghezze d'onda identificate dal modello predittivo.

Tale attività integrativa ha consentito di mettere a punto gli algoritmi ed i metodi che preliminarmente potranno essere usati ed applicati per lo sviluppo di un sensore on-line per la gestione automatica del separatore innovativo e per la quantificazione quali-quantitativa in tempo reale dell'olio ottenuto in uscita dal separatore stesso.

Infine, è stata prodotta una tesi sperimentale LM Scienze e Tecnologie Alimentari, dott.ssa Jasmine Vignati Mouaouia, dal titolo "Impianti innovativi per la separazione olio/acqua e miglioramento della qualità di oli extravergini di oliva".

(<https://drive.google.com/file/d/1YQ0X8OrO4FECcleg43vQ-Sdqclw260Ls/view?usp=sharing>)

### **Attività WP3.1 (gruppo di Microbiologia Industriale - al 30/11/2020)**

Il gruppo di Microbiologia Industriale ha condotto uno screening su 77 ceppi di batteri lattici, appartenenti alle specie *Lactiplantibacillus (Lactpl.) plantarum*, *Lactpl. pentosus* e *Lactpl. paraplantarum*, al fine di individuare colture con caratteristiche interessanti per la produzione di olio extravergine d'oliva (EVO). Nello specifico, 57 ceppi appartenevano alla Collezione di Microrganismi del Laboratorio di Microbiologia Industriale, Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE) dell'Università degli Studi della Basilicata, 8 ceppi alla Collezione di Microrganismi dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, mentre gli altri sono stati isolati da olive naturali e/o trattate con idrossido di sodio delle cultivar *Bella di Cerignola* e *Cellina di Nardò* (Puglia, Italia) e dalle rispettive salamoie. Questi isolati (n. 24) sono stati identificati a livello tassonomico mediante sequenziamento del gene 16S rRNA e Multiplex-PCR e, de-duplicati mediante RAPD-PCR. L'identificazione ha consentito di ottenere 3 ulteriori ceppi appartenenti alla specie *Lactip. plantarum* e 9 ceppi di *Lactip. pentosus*.

Tutti i ceppi sono stati testati per le seguenti caratteristiche: capacità di fermentare lo xilosio in substrato solido (MRS contenente 10 g/L xilosio, dopo 48 ore a 30°C), tolleranza al cloruro di sodio (NaCl 7,5% e 10% w/v, dopo 48 ore a 30°C), capacità di produrre esopolisaccaridi su substrato solido (MRS) contenente glucosio (20 g/L), maltosio (20 g/L) o saccarosio (50 g/L) come fonte di carbonio (incubazione 24 ore a 30°C), capacità di produrre acido  $\gamma$ -amino butirrico (GABA) in substrato addizionato con sodio glutammato (1% w/v; dopo 24 ore a 30°C; mediante cromatografia su strato sottile, TLC), capacità di sintetizzare catalasi eme- e/o Mn-dipendente, capacità inibitoria contro i microrganismi indicatori *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Listeria innocua* e *Lactip. plantarum* (presenti nel microbiota delle olive), capacità di sopravvivere a diverse concentrazioni di alcuni composti fenolici presenti nelle olive (acido gallico 100-6,25 mM; acido protocatecuico 50-3,12 mM, acido 4-idrossibenzoico 40-5,2 mM, acido siringico 25-1,56 mM), e capacità di degradare l'oleuropeina (1 g/L) e produrre idrossitirosolo (mediante TLC).

I risultati hanno mostrato una diversità fisiologica e tecnologica dei ceppi. In merito alla crescita in presenza di xilosio (zucchero presente nelle drupe di oliva), tutti i ceppi erano in grado di utilizzare questo zucchero, ma solo 26 ceppi erano in grado di produrre acido dalla sua fermentazione. Nessuno ceppo era in grado di sopravvivere al 10% NaCl, mentre la maggior parte dei ceppi (n. 57) era in grado di tollerare una concentrazione del 7,5% (w/v) di NaCl; solo 20 ceppi erano capaci di sintetizzare esopolisaccaridi, mentre nessuno produceva GABA. La maggior parte dei ceppi (93%) era capace di produrre catalasi eme-dipendente, ma nessuno era in grado di sintetizzare quella Mn-dipendente. In merito alla capacità antimicrobica, solo 15 ceppi hanno mostrato inibizione nei confronti del lievito *Y. lipolytica*.

I risultati relativi alla tolleranza all'acido gallico, acido protocatecuico, acido 4-idrossibenzoico e acido siringico hanno permesso di raggruppare i ceppi in 3 gruppi, sulla base della diversità nella risposta a questo tipo di stress. Il primo gruppo include i pochi ceppi con la minore tolleranza ai composti fenolici; il secondo gruppo, molto ampio, raggruppa la maggior parte dei ceppi in grado di sopravvivere alla massima concentrazione di acido protocatecuico (40 mM) e acido

siringico (25 mM), ma incapaci di tollerare le più alte concentrazioni di acido gallico (100 mM) e acido 4-idrossibenzoico (40 mM). Infine, il terzo gruppo contiene ceppi caratterizzati dalla più alta tolleranza all'acido gallico (100 mM).

L'oleuropeina è il glicoside responsabile del sapore amaro delle olive e, pertanto, la sua degradazione è indispensabile per rendere i prodotti olivicoli edibili per il consumo umano. L'oleuropeina è idrolizzata in glucosio e aglicone attraverso l'azione dell'enzima  $\beta$ -glucosidasi, e l'aglicone, a sua volta, è convertito in acido elenoico e idrossitirosolo attraverso l'attività dell'enzima esterasi. I ceppi testati avevano una capacità di idrolisi differente: la maggior parte era in grado di degradare oleuropeina e produrre idrossitirosolo; alcuni ceppi erano capaci di degradare oleuropeina ma incapaci di produrre idrossitirosolo; solo pochi ceppi non degradavano oleuropeina, e quindi non producevano i suoi derivati.

La fase di screening ha consentito di selezionare 14 ceppi con caratteristiche interessanti (es. sopravvivenza ad elevate concentrazione di sale, tolleranza ai composti fenolici, degradazione di oleuropeina, produzione di idrossitirosolo, capacità antimicrobica). I ceppi selezionati sono stati successivamente testati per la capacità di sopravvivere in campioni di acqua di vegetazione (cultivar Leccino, Cima di Melfi, Coratina) prelevati dai frantoi individuati per le attività del WP2.2. Le acque di vegetazione (AV) sono state utilizzate come modello di matrice fenolica complessa poiché, come dimostrato in letteratura, hanno un contenuto fenolico simile a quello dalla pasta molita e della pasta gramolata, ma consentono una più semplice diluizione del campione. I ceppi sono stati inoculati in diverse concentrazioni di AV (diluizioni seriali di due in due, da 100% a 0,09%, per avere 1-1024 diluizioni del contenuto iniziale di polifenoli totali) e incubati per 15 minuti. I ceppi hanno mostrato una sopravvivenza che era strettamente dipendente dalla cultivar. I ceppi con la migliore sopravvivenza (O17, OM24, MT2A11S, C17) sono stati utilizzati per valutare la tolleranza alle diverse concentrazioni di AV, per tempi di esposizione più prolungati (fino a 120 min). Inoltre, sui campioni di AV è stata condotta un'analisi del contenuto totale in polifenoli e del profilo fenolico mediante HPLC (collaborazione con ISA-CNR, Avellino), per comprendere i possibili fattori che hanno influenzato le differenze nella sopravvivenza. Sebbene il profilo fenolico (es. presenza di oleuropeina, verbascoside,  $\beta$ -idrossiverbascoside) influenzava i livelli di sopravvivenza, i ceppi O17 e MT2A11S hanno mostrato una buona resistenza a concentrazioni di AV pari a 25-50%, ipotizzando un loro possibile uso nella produzione di olio (es. inoculo sulle drupe, o in fase di gramolatura, o nel mosto oleoso).

Il ceppo con le migliori caratteristiche (*Lactpl. pentosus* O17) è stato selezionato e propagato in fermentatore per produrre una coltura ad elevata densità ( $10^{10}$  ufc/ml), da congelare e liofilizzare per le prove successive. È stato allestito un esperimento preliminare per verificare la solubilità nel mosto oleoso dei campioni di biomassa liofilizzata o congelata, per valutare i diversi livelli di inoculo ( $10^3$  ufc/ml,  $10^5$  ufc/ml,  $10^7$  ufc/ml) e la sopravvivenza. I saggi preliminari hanno dimostrato che la biomassa congelata si risospende con più facilità nel mosto oleoso, senza formare grumi o flocculi, e un livello di  $10^7$  ufc/ml consente un maggior numero di sopravvissuti nel mosto.

Pertanto, queste condizioni saranno utilizzate nelle prove successive.

### ***Attività WP3.2 (gruppo di Tecnologie Alimentari - al 30/11/2020) - Analisi chimica e sensoriale del NUEVOO***

Il gruppo di Tecnologie Alimentari ha lavorato nella caratterizzazione degli oli prodotti nel corso delle prove sperimentali afferenti al WP 2.2. al fine di valutare l'effetto dei fattori sperimentali (cultivar e tecnologia di produzione) sulle caratteristiche chimico-fisiche degli oli. Oltre alle analisi convenzionali sono stati implementati una serie di protocolli analitici per l'analisi quali-quantitativa della componente fenolica. Nello specifico sono stati determinati i seguenti parametri: acidità (% ac. Oleico); numero di perossidi (meq O<sub>2</sub>/Kg); indici spettrofotometrici (k<sub>232</sub>, k<sub>268</sub>, k<sub>262</sub> k<sub>274</sub>, ΔK); polifenoli totali (mg GAE/g olio); indice d'amaro (I.B.); carotenoidi (mg pheophytina/Kg olio); clorofille (mg luteina/Kg olio).

I risultati ottenuti hanno evidenziato un effetto significativo di entrambi i fattori sulla quasi totalità dei parametri determinati. Per quanto riguarda il contenuto di composti fenolici, potenzialmente legati con la stabilità ossidativa degli stessi, è stato evidenziato un effetto della tecnologia ROTASED particolarmente rilevante e significativa per i campioni ottenuti dalla lavorazione della cultivar Leccino.

Le analisi eseguite al tempo zero sono state replicate a 6 mesi della produzione evidenziando un effetto significativo del fattore tempo su tutti i parametri oggetto di valutazione. Per completare lo studio dell'effetto della tecnologia di produzione sull'evoluzione dei parametri chimico-fisici durante la conservazione sono in corso di esecuzione le analisi a 12 mesi.

La caratterizzazione degli oli sperimentali doveva essere completata dalla determinazione del profilo sensoriale e dalla valutazione dell'effetto della tecnologia di produzione sull'intensità degli attributi e sulla comparsa di eventuali difetti. Purtroppo, l'emergenza COVID-19 e le limitazioni connesse all'ingresso in ateneo di soggetti esterni non hanno consentito il regolare svolgimento delle analisi sensoriali. Tuttavia, è stata messa a punto una procedura di valutazione che, oltre alla mera determinazione delle caratteristiche sensoriali, consentirà di validare e migliorare un indice rapido e strumentale per la predizione dell'amaro e del gradimento degli oli. Le attività connesse alle analisi sensoriali sono state completate dalla selezione e addestramento del panel da utilizzare per le valutazioni sensoriali degli oli che verranno prodotti nel prosieguo della sperimentazione.

Le attività del WP 3.2 sono state completate dalla valutazione della stabilità ossidativa e dalla predizione della shelf-life degli oli sperimentali mediante l'utilizzo del reattore Oxitest® (Velp Scientifica, Usmate, MB, Italy). Viene registrata l'evoluzione della pressione di ossigeno all'interno della camera di reazione, la pressione decresce in maniera più o meno rapida all'insorgere dell'ossidazione. L'IP corrisponde al punto di intersezione tra la tangente alla curva che descrive l'ossidazione del campione e la retta secante nel punto di tangenza. Il risultato ottenuto è un tempo di induzione (IP). Il tempo di induzione rappresenta il tempo necessario a raggiungere l'inizio dell'ossidazione. Maggiore è il tempo di induzione maggiore sarà la resistenza all'ossidazione della matrice grassa. Per gli oli prodotti dalla cultivar Coratina le analisi condotte non hanno evidenziato nessun effetto significativo del fattore tecnologia di produzione in quanto non sono state riscontrate differenze significative nei tempi di induzione registrati per i vari campioni sperimentali. Effetto significativo che invece è stato riscontrato negli oli della cultivar Leccino per i quali sono stati

registrati tempi di induzione significativamente più bassi per tutti gli oli prodotti con il ROTASED. Le analisi della stabilità ossidativa sono state replicate a intervalli di tempo regolari e sono tutt'ora in corso al fine di validare un metodo di predizione della shelf-life mediante l'utilizzo dell'OXISoft™ (Velp Scientifica).



---

## The IT4NUEVOO Project: Coordinator's mid-term report

---

*Giovanni Carlo Di Renzo (Coordinatore Scientifico del Progetto)*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

The IT4NUEVOO project (Ministerial Decree no. 30311 of 31/10/2018 and Concession Ministerial Decree no. 18235/7110/2019 of 24/09/2019) will end on 30/11/2022.

### Mid-term monitoring report

#### *WP1 Activity - Coordination*

#### *WP4 activity - Plan for the exploitation of results, impact and dissemination of results*

In February 2019, the design and construction phase of the project website began. It was therefore decided to use the Google Sites tool to prepare the structure of the site and to upload all related information documents.

The website is currently used to disseminate the activities and results of the project.

The site is currently available at the following web address:

<https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/>

For the progress of the various activities of the project there is a special section.

(<https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivit%C3%A0-del-progetto>)

Preliminarily, a meeting of all the partners was organized for the presentation of the beginning of the project (Kick-off Meeting: Innovative plants and technologies for the extraction of a new nutraceutical extra virgin olive oil with a high content of healthy substances <https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivit%C3%A0-del-progetto/avvio-a1m01>).

The meeting took place in room A1 of the University of Basilicata on 10/06/2019 which was attended by students and teachers of UNIBAS as well as entrepreneurs from the business world and in particular from the olive oil production sector.

There were interventions and presentations both by institutional representatives (Councillor for Agriculture of the Basilicata Region) and by the individual operational units that collaborate on the project.

In particular, the interventions concerned:

- Innovative plants for oil/water separation and improvement of the quality of extra virgin olive oils (G.C. Direnzo, G. Altieri e F. Genovese)

(<https://drive.google.com/file/d/1LsftRiM924yxVIQlqY08gpjLV5QKZmVl/view?usp=sharing>)

- Technological innovation and quality of extra virgin olive oils (A. Leone, R. Romaniello e A. Tamborrino)

(<https://drive.google.com/file/d/1SHE3Np5wJzv1wMN5WHV0zMjTtQlhEBte/view?usp=sharing>)

- Effect of lactic acid bacteria on the quality of olives and extra virgin olive oil (A. Ricciardi e T. Zotta)

(<https://drive.google.com/file/d/1YJ9rzoQZGPLXKxsYg5KUtZZKf6eXNvuO/view?usp=sharing>)

- Chemical and sensory evaluations in conventional and innovative extra virgin olive oils (F. Galgano, M.C. Caruso e N. Condelli)

(<https://drive.google.com/file/d/1e9-lxLxDOGSrWlxKn4H5v-xBKYVho3HT/view?usp=sharing>)

The procedure for the on-line management of the physical and financial progress of the project has been developed. The procedure uses a Google Drive shared between the various project partners that allows, through appropriate access management, the reading of all documents to all the partners involved. The writing, and therefore the entry of the specific documents required in the various time stages, is divided into actions, so each partner can insert the documents only in the folder related to his specific activity. Access is reserved only for the components of the O.U. of the project.

On 17/09/2019 a coordination meeting was held for the definition of the test and analysis protocols, during the same meeting the mills where the experimental tests will be performed were identified.

([https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivita%3%A0-del-progetto?%23h.p\\_1pNg9GDdw0\\_U#h.p\\_1pNg9GDdw0\\_U](https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/attivita%3%A0-del-progetto?%23h.p_1pNg9GDdw0_U#h.p_1pNg9GDdw0_U))

On 04/11/2020 a remote coordination meeting of the various operational units took place. The situation of the various activities was taken stock and the activities already carried out were exposed. In addition, the setting of the new experimental tests that will be carried out has been described.

### ***Activity WP2.1 (Agricultural Mechanics Group - UNIFG- as of 30/11/2020)***

The activities of the operating unit of the University of Foggia (dept. DAFNE, ex SAFE), on 30/11/2020, had as their object the development of the points of WP2.1.1 (Choice of suitable ultrasonic system) and WP2.1.2. (Comparative tests of oil extraction).

#### ***WP2.1.1***

In the initial phase of the project, a screening was performed to define the use of a suitable ultrasonic machine to be used in an oil extraction plant. The choice fell on a machine capable of processing olive paste at mass capacities up to 5000 kg / h. The first phase involved the development of the machine in order to prepare it for quick connection to a pre-existing extraction line. The

machine was equipped with DIN flanges and pressure and temperature control systems for the olive paste in transit. Regarding the operational functionalities of the machine, tests were performed to establish the inlet pressure limits of the olive paste and the parameters of the transducer to transmit the ultrasound to the olive paste.

The transmission of ultrasound to the olive paste was guaranteed by a cylindrical sonotrode inserted into a steel pipe, with inlet and outlet sections of the olive paste. Initially a simple geometry sonotrode was used, later replaced by a complex geometric sonotrode, in order to increase the contact surface between it and the olive paste.

The control system of the machine, consisting of a PLC, allowed to interface the sonotrode with a booster, controlling its operation and operating thresholds, ensuring the disconnection of the power supply in case of electrical over-absorption (exceeding 3,500 W for more than 5 seconds). Through the touch-screen of the PLC it was possible to control in real time, the electrical absorption, the operating pressure, the frequency and the amplitude of the vibration of the sonotrode. The working conditions of the machine have been set in such a way as to give the olive paste a specific energy of about 15 kJ/kg.

### **WP2.1.2**

The functional tests of the machine were conducted in an oil extraction plant, at the company "Oleificio Cericola s.r.l." – Incoronata (FG). The plant has an hourly flow rate of 5000 kg/h and consists of: 1. Branch and leaf remover; 2. Washing machine; 3. Partial pitting fringe (Moliden-Leone model); kneading group (6 units); 4. Horizontal centrifuge and 3 outputs; 5. Vertical centrifuge.

The ultrasonic machine was installed in two different points of the extraction system: a) between the breaker-pitter and the kneading group; (b) between the kneading unit and the horizontal centrifuge. In this way, the effect of ultrasound in the pre and post kneading phase was investigated. The comparative tests were planned using homogeneous batches of olives, Cultivar Coratina. Extractions were performed without (control tests) and with the use of the ultrasonic machine (pre and post kneading).

The verification of the functionality of the machine was carried out by evaluating the quantitative performance of the extraction plant. To this end, samples of olives, olive paste, exhausted pomace and vegetation water were taken. The quantitative parameters useful for defining the performance of the plant were determined: average oil content in olives; residual oil content in the pomace; residual oil content in vegetation water. Through the mass balance performed on each extraction test, the extractability value was calculated, i.e. the ratio between the quantity of oil extracted and the amount of oil actually contained in the olives.

The results obtained showed a statistically significant effect of the ultrasonic machine, regarding the quantitative performance of the plant at a mass flow rate of 3000 kg / h, in the configuration that provided for the ultrasonic machine positioned upstream of the kneading machines.

The experimental tests are also being carried out in the present oil campaign, 2020/2021, with modifications to the machine so as to be able to work at hourly flow rates greater than 3000 kg / h.

***Activity WP 2.2 (Agricultural Mechanics group - UNIBAS- as of 30/11/2020) - Design, construction and patent of an oil/water/sludge separator to improve the final quality of EVOO.***

The two oil mills where the experimental tests were carried out have been identified: Frantoio Oleario Ruscigno C.da Santa Teresa, SNC, Tricarico (MT); Masseria Curtimaggio C.da Curtimaggio, 9, Grottaglie (TA).

Experimental comparison tests were carried out in the two oil mills in Grottaglie (TA) and Tricarico (MT) using CVs. Cima di Melfi, Coratina and Leccino.

The use of the experimental prototype (ROTASED) for liquid-liquid separation was evaluated with the aim of defining the design criteria for the construction of a prototype plant for the separation of olive oil from the oily must leaving the decanter, in order to eliminate most of the residual water without resorting to the centrifugal separator; The latter, in fact, negatively affects the quality of olive oil, causing the loss of "body" due to high oxygenation.

The data of the chemical-physical and spectrophotometric comparison analyzes on the samples collected during the experimental tests were evaluated. In particular, the following were considered: the Colorimetric Analysis (olives), the Turbidimetric Analysis (oil), the Vis and NIR spectrophotometric determinations in 10mm quartz cuvette (oil), the VIS spectrophotometric determination with integrating sphere in petri dish (kneaded paste and pomace), the content in water, dry residue and fat residue (pomace).

The experimental data obtained with the innovative Rotated separator, used for the final cleaning of the oily must before its subsequent bottling, highlight the effectiveness of the same in cleaning the oil and the possibility of replacing the traditional vertical axis centrifugal separators that are normally used in the final oil cleaning phase. However, unlike the latter, Rotased avoids excessive oxygenation and generates less oil heating, originating from the machines during separation. In addition, Rotased preserves the most important sensory and nutritional properties of an extra-virgin olive oil. Overall, the evidence collected represents a starting point for the preparation of the plant to be used industrially for the production of a "turbid" extra virgin olive oil. From the observation of the data obtained it can be seen that the chemical parameters of all the samples under study fall within the legal limits established for the category of Extra-Virgin Olive Oils.

Also following the results obtained in these tests, Rotased received the patent certificate for industrial invention from the Ministry of Economic Development – Italian Patent Office on 28/01/2019 with the number 102016000078140.

For the number of peroxides, the average concentrations in the samples treated with Rotased (Sedoil) and with the traditional centrifuge (Cenoil) were respectively: 10.41 and 12.01 mEqO<sub>2</sub>/kg for Cv. Cima di Melfi; 8.55 and 8.15 mEqO<sub>2</sub>/kg for Cv. Coratina; 6.59 and 7.39 mEqO<sub>2</sub>/kg for

Cv. Leccino. These results confirm the deep oil-air contact (oxygen) that occurs during the centrifugation operation, representing an important source of ignition of oxidative processes.

As far as the polyphenol content is concerned, the Cenoil samples showed a lower value of this parameter than for Sedoil (for Cv. Coratina only and on all three different centrifugal rotation speeds). This result confirms the oxidizing action produced by the cleaning operation performed during the passage in the vertical centrifugal separator.

A fluid-dynamic simulation of the operation of the prototype itself was conducted using OpenFoam, an open-source software for fluid dynamics and multiphysics simulation. We simulated a two-phase incompressible 2D flow, with rotation and gravity. A k-epsilon SST turbulence model was used, which lends itself well to describing fluctuating regimes from laminar to turbulent, even if the test cases of interest are laminar. In particular, laminar operation is preferred to avoid mixing between the phases, and to have an optimal separation of the same. The two-phase flow is resolved through a VOF (Volume Of Fluid) model. It characterizes the two-phase flow through the Navier-Stokes equations written for the mixture, and solving a new equation for the volume fraction ( $\alpha$ ) that describes the degree of presence of the two phases in a given volume.

The fluid-dynamic simulation has shown and clarified how an increase in flow generates different flow regimes within the centrifuge, but does not succeed by itself in making the two outlets selective for the two different phases.

As an integrative activity, the spectrophotometric correlation on pomace and oil was studied and fine-tuned, through Matlab scripts, determined for 3 parameters considered important in the management of the centrifugal decanter for oil extraction: the fat residue on the dry; the greasy residue on the wet; the water content in the pomace. The forward stepwise regression method was used, which allowed a small number of wavelengths to be selected, which will make it possible to build a portable instrument with discrete filters or LED diodes calibrated exactly on the wavelengths identified by the predictive model.

This integrative activity has allowed to develop the algorithms and methods that can be used and applied in advance for the development of an on-line sensor for the automatic management of the innovative separator and for the qualitative-quantitative quantification in real time of the oil obtained at the exit from the separator itself.

Finally, an experimental thesis was produced (Food Science and Technology), Dr. Jasmine Vignati Mouaouia, entitled "Innovative plants for oil/water separation and improvement of the quality of extra virgin olive oils".

<https://drive.google.com/file/d/1YQ0X8OrO4FECcleg43vQ-Sdqclw260Ls/view?usp=sharing>

### **Activity WP3.1 (Industrial Microbiology group - as of 30/11/2020)**

The Industrial Microbiology group conducted a screening on 77 strains of lactic acid bacteria, belonging to *the species Lactiplantibacillus (Lactpl.) plantarum, Lactpl. pentosus and Lactpl. paraplantarum*, in order to identify crops with interesting characteristics for the production of extra virgin olive oil (EVO). Specifically, 57 strains belonged to the Collection of Microorganisms of the Laboratory of Industrial Microbiology, School of Agricultural, Forestry, Food and Environmental

Sciences (SAFE) of the University of Basilicata, 8 strains to the Collection of Microorganisms of the University of Naples Federico II, while the others were isolated from natural olives and / or treated with sodium hydroxide of the *Bella di Cerignola* cultivars and *Cellina di Nardò* (Puglia, Italy) and their respective brines. These isolates (n. 24) were identified at the taxonomic level by sequencing of the 16S rRNA and Multiplex-PCR genes and de-duplicated by RAPD-PCR. The identification allowed to obtain 3 additional strains belonging to the species *Lactip. plantarum* and 9 strains of *Lactip. pentosus*.

All strains were tested for the following characteristics: ability to ferment xylose in solid substrate (MRS containing 10 g/L xylose, after 48 hours at 30°C), tolerance to sodium chloride (NaCl 7.5% and 10% w/v, after 48 hours at 30°C), ability to produce exopolysaccharides on a solid substrate (MRS) containing glucose (20 g/L), maltose (20 g/L) or sucrose (50 g/L) as a carbon source (24-hour incubation at 30°C), ability to produce  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) as a substrate with added sodium glutamate (1% w/v; after 24 hours at 30°C; by thin layer chromatography, TLC), ability to synthesize heme- and/or Mn-dependent catalase, inhibitory capacity against indicator microorganisms *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Listeria innocua* and *Lactip. plantarum* (present in the microbiota of olives), ability to survive different concentrations of certain phenolic compounds present in olives (gallic acid 100-6.25 mM; protocatechuic acid 50-3.12 mM, 4-hydroxybenzoic acid 40-5.2 mM, syringic acid 25-1.56 mM), and ability to degrade oleuropein (1 g/L) and produce hydroxytyrosol (by TLC).

The results showed a physiological and technological diversity of the strains. Regarding growth in the presence of xylose (sugar present in olive drupes), all strains were able to use this sugar, but only 26 strains were able to produce acid from its fermentation. No strain was able to survive 10% NaCl, while most strains (No. 57) were able to tolerate a concentration of 7.5% (w/v) NaCl; only 20 strains were able to synthesize exopolysaccharides, while none produced GABA. Most strains (93%) were capable of producing heme-dependent catalase, but none were able to synthesize Mn-dependent catalase. Regarding antimicrobial capacity, only 15 strains showed inhibition against *Y. lipolytica* yeast.

The results related to tolerance to gallic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid and syringic acid allowed to group the strains into 3 groups, based on the diversity in the response to this type of stress. The first group includes the few strains with the least tolerance to phenolic compounds; the second group, very large, groups most of the strains able to survive at the maximum concentration of protocatechuic acid (40 mM) and syringic acid (25 mM), but unable to tolerate the highest concentrations of gallic acid (100 mM) and 4-hydroxybenzoic acid (40 mM). Finally, the third group contains strains characterized by the highest tolerance to gallic acid (100 mM).

Oleuropein is the glycoside responsible for the bitter taste of olives and, therefore, its degradation is essential to make olive products edible for human consumption. Oleuropein is hydrolyzed into glucose and aglycone through the action of the enzyme  $\beta$ -glucosidase, and aglycone, in turn, is converted to elenoic acid and hydroxytyrosol through the activity of the enzyme esterase. The strains tested had a different hydrolysis capacity: most were able to degrade oleuropein and produce hydroxytyrosol; some strains were capable of degrading oleuropein but unable to produce

hydroxytyrosol; Only a few strains did not degrade oleuropein, and therefore did not produce its derivatives.

The screening phase allowed to select 14 strains with interesting characteristics (e.g. survival with high salt concentration, tolerance to phenolic compounds, oleuropein degradation, hydroxytyrosol production, antimicrobial capacity). The selected strains were subsequently tested for their ability to survive in vegetation water samples (Leccino, Cima di Melfi, Coratina cultivars) taken from the mills identified for WP2.2 activities. Vegetation water (AV) has been used as a model of complex phenolic matrix because, as demonstrated in the literature, they have a phenolic content similar to that of milled pasta and kneaded pasta, but allow a simpler dilution of the sample. The strains were inoculated in different concentrations of AV (serial dilutions of two in two, from 100% to 0.09%, to have 1-1024 dilutions of the initial total polyphenol content) and incubated for 15 minutes. The strains showed survival that was strictly dependent on the cultivar. The strains with the best survival (O17, OM24, MT2A11S, C17) were used to assess tolerance to different concentrations of AV, for longer exposure times (up to 120 min). In addition, an analysis of the total polyphenol content and phenolic profile by HPLC was performed on the AV samples (collaboration with ISA-CNR, Avellino), to understand the possible factors that influenced the differences in survival. Although the phenolic profile (e.g. presence of oleuropein, verbascoside,  $\beta$ -hydroxyverbascoside) influenced survival levels, the O17 and MT2A11S strains showed good resistance to AV concentrations of 25-50%, assuming their possible use in oil production (e.g. inoculation on drupes, or during kneading, or in oily must).

The strain with the best characteristics (*Lactpl. pentosus* O17) was selected and propagated in a fermenter to produce a high-density culture ( $10^{10}$  cfu/ml), to be frozen and freeze-dried for subsequent tests. A preliminary experiment was carried out to verify the solubility in oily must of freeze-dried or frozen biomass samples, to evaluate the different inoculum levels ( $10^3$  cfu/ml,  $10^5$  cfu/ml,  $10^7$  cfu/ml) and survival. Preliminary tests have shown that frozen biomass resuspends more easily in oily wort, without forming lumps or flocs, and a level of  $10^{10}$  cfu/ml allows a greater number of survivors in the wort.

Therefore, these conditions will be used in subsequent tests.

### ***Activity WP3.2 (Food Technologies group - as of 30/11/2020) - Chemical and sensory analysis of NUEVOO***

The Food Technologies group worked in the characterization of the oils produced during the experimental tests related to WP 2.2. in order to evaluate the effect of experimental factors (cultivars and production technology) on the chemical-physical characteristics of oils. In addition to conventional analyses, a series of analytical protocols have been implemented for the quantitative analysis of the phenolic component. Specifically, the following parameters were determined: acidity (% ac. Oleic); number of peroxides (meq O<sub>2</sub>/kg); spectrophotometric indices (k<sub>232</sub>, k<sub>268</sub>, k<sub>262</sub> k<sub>274</sub>,  $\Delta K$ ); total polyphenols (mg GAE/g oil); bitterness index (I.B.); carotenoids (mg pheophytin/kg oil); chlorophylls (mg lutein/kg oil).

The results obtained showed a significant effect of both factors on almost all the parameters determined. With regard to the content of phenolic compounds, potentially linked with their oxidative stability, an effect of ROTASED technology was highlighted that is particularly relevant and significant for the samples obtained from the processing of the Leccino cultivar.

The analyses performed at zero time were replicated at 6 months of production, highlighting a significant effect of the time factor on all the parameters being evaluated. To complete the study of the effect of production technology on the evolution of chemical-physical parameters during storage, 12-month analyses are being performed.

The characterisation of the experimental oils was to be completed by the determination of the sensory profile and the evaluation of the effect of the production technology on the intensity of the attributes and the appearance of any defects. Unfortunately, the COVID-19 emergency and the limitations related to the entry into the university of external subjects have not allowed the regular performance of sensory analyses. However, an evaluation procedure has been developed which, in addition to the mere determination of sensory characteristics, will allow to validate and improve a rapid and instrumental index for the prediction of bitterness and liking. The activities related to sensory analysis were completed by the selection and training of the panel to be used for sensory evaluations of the oils that will be produced in the continuation of the experimentation.

The activities of WP 3.2 have been completed by the evaluation of oxidative stability and the prediction of the shelf-life of experimental oils through the use of the Oxitest® reactor (Velp Scientifica, Usmate, MB, Italy). The evolution of the oxygen pressure inside the reaction chamber is recorded, the pressure decreases more or less rapidly with the onset of oxidation. The IP corresponds to the point of intersection between the tangent to the curve describing the oxidation of the sample and the secant line at the tangency point. The result is an induction time (IP). The induction time represents the time it takes to reach the beginning of oxidation. The longer the induction time, the greater the resistance to oxidation of the fat matrix. For the oils produced by the Coratina cultivar, the analyses carried out did not show any significant effect of the production technology factor as no significant differences were found in the induction times recorded for the various experimental samples. A significant effect that instead was found in the oils of the Leccino cultivar for which significantly lower induction times were recorded for all oils produced with ROTASED. The analyses of oxidative stability have been replicated at regular time intervals and are still ongoing in order to validate a shelf-life prediction method using OXISoft™ (Scientific Velp).

---

## Il Progetto IT4NUEVOO: presentazione dei risultati ottenuti

---

*Università della Basilicata - Aula Magna sede Campus Rione Francioso, 17 Novembre 2022*

---

## The IT4NUEVOO Project: presentation of the achieved results

---

*University of Basilicata - Aula Magna at "Rione Francioso" Campus, 17 November 2022*

<https://sites.google.com/unibas.it/iti4nuevoo/>



L'evento divulgativo dei risultati finali del progetto IT4NUEVOO si è svolto

**Giovedì 17 Novembre 2022, ore 15:30-17:30**

L'evento è stato svolto in presenza con la possibilità di seguire lo svolgimento e la presentazione delle relazioni anche a distanza tramite l'utilizzo di Google Meet.

Sede di svolgimento: **Università della Basilicata - Aula Magna sede Campus Rione Francioso**

The dissemination event of the final results of the IT4NUEVOO project took place on

**Thursday 17 November 2022, h. 15:30-17:30**

The event was held in presence with the possibility to attend the discussion and the presentation of the reports even remotely through the use of Google Meet.

Location: **University of Basilicata - Aula Magna at "Rione Francioso" Campus**



---

# Gli impianti di separazione olio / acqua per migliorare la qualità finale degli oli extravergini: valutazione tecnica e risultati sperimentali

---

*Attilio Matera\*, Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Giuseppe Genovese, Luciano Scarano, Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

## **Introduzione**

La crescente attenzione da parte del consumatore verso il ruolo che riveste l'alimentazione nella salvaguardia della salute ha consentito di inserire l'olio extra vergine d'oliva tra gli alimenti con un elevato significato funzionale e salutistico. Gli utilizzi dell'olio d'oliva sin dall'antichità sono stati i più vari, infatti anche se il ruolo più importante lo riveste nell'alimentazione per la cottura dei cibi e come condimento, l'olio di oliva è anche stato un componente dei medicinali più antichi. Diversi studi hanno dimostrato, infatti, che alcuni composti, principalmente sostanze fenoliche, sono correlati ad una lunga serie di effetti positivi sulla salute umana (1,2). I polifenoli presenti nell'olio d'oliva sono antiossidanti naturali che hanno effetti benefici per la nostra salute, ma anche per la stabilità dell'olio stesso poiché ne aumenta la conservabilità difendendolo dal danno ossidativo (3,4). La produzione di polifenoli, che avviene nelle cellule oleifere, è dovuta a reazioni catalizzate dal corredo enzimatico cellulare, il quale è determinato su base genetica e indotto da un insieme di fattori ambientali come il clima e il territorio. Ne risulta che il profilo quali-quantitativo di un olio è strettamente legato alla terra di produzione caratterizzata da determinati tipi di cultivar, condizioni climatiche e da un adeguato processo produttivo. Essi intervengono come antiossidanti diretti, abbassano i livelli di colesterolo e inibiscono la perossidazione delle LDL, rallentano la crescita tumorale inibiscono alcuni cancerogeni chimici, rallentano l'aggregazione piastrinica e, infine, svolgono attività anallergica e antinfiammatoria.

Fondamentale è anche l'aspetto sensoriale dell'olio extra vergine di oliva, rappresentato dall'insieme delle proprietà che lo rendono "accettabile" o "desiderabile" da parte del consumatore. La qualità sensoriale comprende quindi la valutazione del colore, dell'aroma e del gusto dell'alimento. Il colore è la prima valutazione sensoriale eseguita dal consumatore. I composti responsabili del colore degli oli vergini di oliva fanno parte dei costituenti minori. Trattasi di pigmenti liposolubili quali le clorofille, responsabili del colore verde, e dei carotenoidi che conferiscono il colore giallo. La nota olfattiva deriva da una serie di composti parzialmente volatili a temperatura ambiente, che li rende percettibili a livello di membrana olfattiva. Alcuni di questi composti, come ad esempio gli alcoli terpenici ed alcuni esteri sono definiti aromi "originari" in quanto pre-esistenti nel frutto. Altri, invece, quali aldeidi e alcoli sono chiamati aromi di "derivazione" in quanto si tratta di composti che si formano nel corso della frangitura delle olive per effetto di meccanismi enzimatici

endogeni catalizzati dalla lipossigenasi. Questi composti sono responsabili della sensazione di “fruttato” che per un olio di oliva rappresenta un elevato grado di qualità sensoriale.

Il gusto degli oli vergini di oliva è da ricondurre alla sensazione di “pungente” e di “amaro” probabilmente legata ad alcuni composti di natura fenolica. La fase “gusto-olfatto” dell’esame sensoriale è sicuramente la più complessa in quanto coinvolge contemporaneamente i composti volatili e non volatili ad impatto sensoriale e può evidenziare eventuali effetti sinergici legati alla loro combinazione.

Gli attributi sensoriali dell’olio vergine di oliva, sono da imputare alla forte stimolazione dei recettori sensoriali umani provocate sia da sostanze non-volatili sia da sostanze volatili (5,6,7,8).

Queste particolari caratteristiche degli oli extravergini sono più facili da apprezzare in quanto il consumatore può esprimere sulla base delle proprie percezioni sensoriali un giudizio di qualità sull’olio utilizzato. Sono proprio queste le caratteristiche che negli ultimi anni hanno determinato una crescente domanda di olio extravergine di elevata qualità, pertanto la scelta delle tecnologie e l’opportuna progettazione dei processi di estrazione rappresentano un importante strumento per tutelare e valorizzare le caratteristiche organolettiche e nutrizionali dell’olio durante il processo di trasformazione. Tutte le operazioni coinvolte nel processo di estrazione hanno, infatti, lo scopo di estrarre l’olio dal frutto conservando quanto più è possibile le caratteristiche organolettiche e nutrizionali originali. In tale ottica l’estrazione meccanica consente di estrarre i trigliceridi nella forma più integra possibile, consentendo di preservare il maggior numero possibile di composti minori che caratterizzano l’olio d’oliva dal punto di vista organolettico e favorisce la formazione di nuovi composti chimici aromatici che nella drupa non erano presenti, ma che si originano dall’azione degli enzimi liberati dalla rottura dei tessuti vegetali.

Per l’ottenimento di un olio di qualità sono necessari, inoltre, un giusto grado di maturazione delle drupe, idonee modalità di raccolta ed estrazione, non trascurando infine opportune misure igienico-sanitarie perseguibili attraverso un’adeguata difesa fitosanitaria e razionali operazioni di raccolta, post-raccolta e trasformazione che mirino a rendere minime le manipolazioni del prodotto. In definitiva, la qualità dell’olio di oliva si riesce ad ottenere solo attraverso il rispetto e la salvaguardia delle proprietà intrinseche del prodotto originale esaltate attraverso un razionale processo di estrazione.

Tali esigenze richiedono un maggior ordinamento fra la ricerca scientifica, l’industria costruttrice di macchine olearie e i produttori, al fine di proporre tecnologie innovative che esaltino la qualità dell’olio, senza penalizzare le rese di estrazione.

### **Processo di estrazione dell’olio extra vergine d’oliva**

L’olio vergine di oliva è un olio ottenuto unicamente attraverso processi meccanici o altri processi fisici, in condizioni tali da non causare alterazioni dell’olio, e che non ha subito alcun trattamento diverso dal lavaggio, dalla decantazione, dalla centrifugazione e dalla filtrazione. L’obiettivo dei metodi di estrazione consiste nell’estrarre il più possibile il quantitativo di olio dal frutto senza alterarne la qualità originale. Per questo motivo, è essenziale utilizzare unicamente

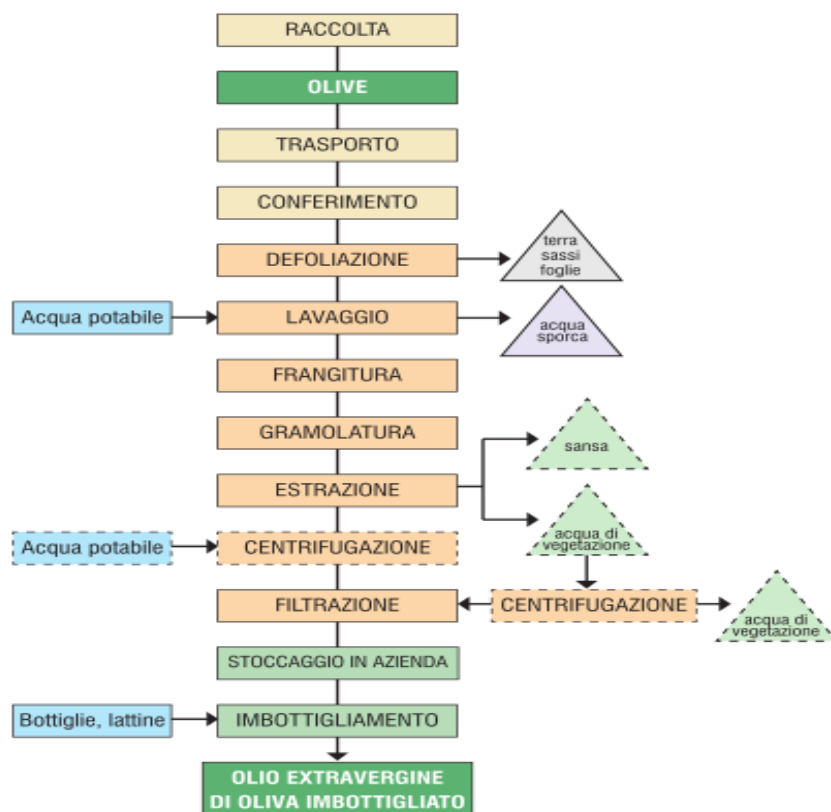
metodi meccanici o fisici, evitando reazioni chimiche o enzimatiche che ne possono alterare la composizione naturale.

La qualità dell'olio, infatti, è determinata principalmente:

- dallo stato di maturazione delle olive al momento della lavorazione;
- dalla tecnologia di estrazione;
- dalla delicata fase di condizionamento-conservazione dell'olio.

Le differenti operazioni tecnologiche possono portare ad un profondo cambiamento nella composizione dell'olio in seguito alla trasformazione di alcuni componenti naturali dell'oliva (in seguito ad interventi enzimatici ed ossidativi) ed alla ripartizione dei componenti aromatici ed antiossidanti tra la fase oleosa, la matrice solido-colloidale della pasta di olive e l'acqua di vegetazione.

Il processo di estrazione dell'olio vergine di oliva si compone di una serie di operazioni che portano alla liberazione della maggiore quantità possibile di olio contenuto nei vacuoli cellulari della drupa (Fig. 1).



**Fig. 1. Diagramma di flusso processo produttivo olio.**

L'estrazione diventa tanto più difficoltosa quanto più la quantità di olio è disperso in goccioline piccolissime nel sistema colloidale della pasta di olive o in emulsione con l'acqua di vegetazione. Le goccioline d'olio, che vengono liberate in seguito alla rottura delle cellule, si riuniscono in gocce più grandi durante la fase di gramolazione attraverso il fenomeno fisico della coalescenza, fino a raggiungere dimensioni tali da poter essere separate in una fase liquida continua: il mosto oleoso.

Il mosto oleoso in uscita dagli impianti di estrazione ha caratteristiche fisiche e chimiche che dipendono dalle tecnologie impiegate a monte del processo, in particolar gli impianti di separazione olio-sansa possono influire sia sulle proprietà sensoriali e sulla stabilità ossidativa, giocando un ruolo fondamentale sulla quantità e attività dei composti fenolici. La separazione del mosto oleoso dalla sansa di olive per pressione, sebbene restituisca un prodotto con più polifenoli, è stato attualmente quasi completamente sostituito dall'estrazione per separazione centrifuga orizzontale (decanter) a due o tre fasi, che ha consentito di dare continuità al processo e ridurre i tempi di estrazione (Fig. 2).

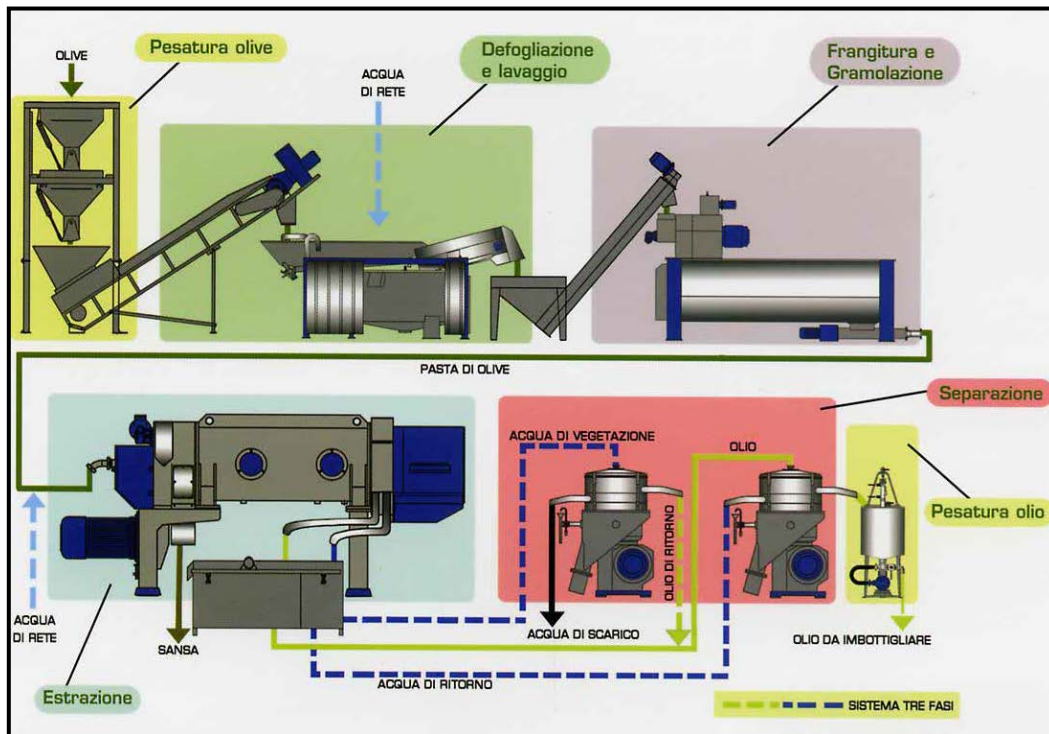


Fig. 2. Metodo continuo - estrazione con decanter a tre fasi.

### Impianti per la chiarificazione del mosto oleoso

Qualunque sia il sistema di estrazione che il frantoio oleario adotta, il mosto oleoso che si separa dall'impianto, è sempre accompagnato da quantità più o meno elevate di acqua di vegetazione e di piccoli frammenti vegetali. Il contenuto di acqua di vegetazione e solidi varia nel mosto oleoso varia dal 2-5% nel decanter a tre fasi fino al 5-15% nel decanter a due fasi.

L'acqua e i solidi vengono separati per le diverse densità dei liquidi, mediante due diverse tecniche:

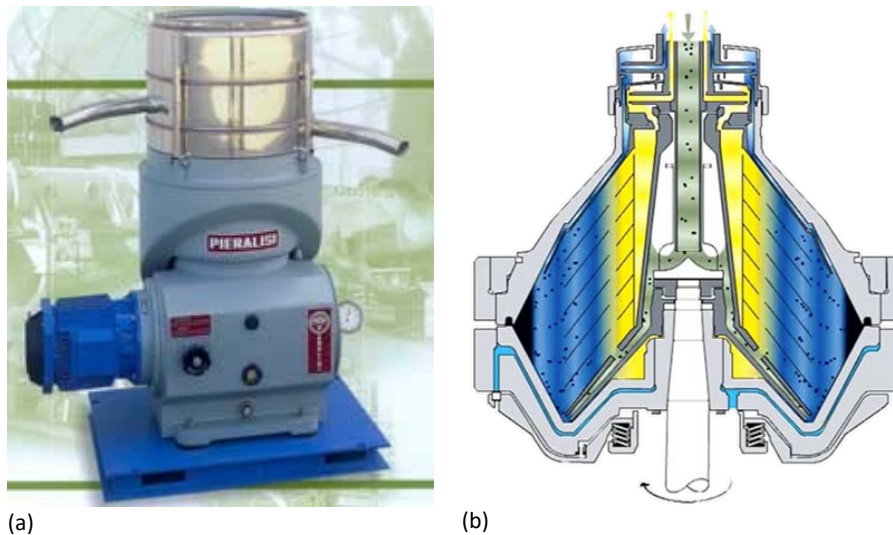
- decantazione;
- centrifugazione.

La decantazione è un metodo tradizionale, basato sulla non miscibilità dell'olio con l'acqua di vegetazione. Durante la fase di riposo l'olio, essendo più leggero dell'acqua, tende ad affiorare in superficie separandosi.

Dopo questa prima fase è necessario separare ancora l'acqua residua presente nell'olio; tale operazione richiede tempi più lunghi di stazionamento dell'olio in vasche di apposita muratura. Questo metodo è stato del tutto abbandonato, perché non consente di ottenere oli di elevata qualità. Oggi, la fase liquida proveniente dai vari strati di estrazione viene separata mediante separatori verticali a dischi (Fig. 3).

Le centrifughe a dischi presentano l'asse di rotazione verticale e sono note anche come centrifughe a calotte. Ruotando a elevata velocità (circa 5000-6000 rpm), consentono, da una parte, di far ottenere un olio vergine di oliva pulito, anche se ancora leggermente torbido e, dall'altra, di recuperare quella piccola parte di olio dispersa in emulsione nella fase acquosa.

Questo tipo di centrifughe sono formate da una serie di piatti tronco-conici, posti alla distanza di 1 mm circa l'uno dall'altro e montati sull'albero cavo del tamburo.



**Fig. 3. Centrifuga verticale a dischi (a); sezione della centrifuga, (2)**

In tale centrifuga l'alimentazione avviene dall'alto lungo un tubo centrale e fisso che sfocia in uno di diametro maggiore, rotante, il quale porta alla sua estremità inferiore un disco conico, alettato nella parte inferiore (chiamato distributore) per guidare il flusso verso l'esterno aiutandolo ad aumentare la sua velocità fino al valore previsto dalla centrifugazione. Sopra tale disco ne sono sovrapposti altri (circa un centinaio). Essi sono caratterizzati da risalti radiali sul dorso e hanno uno spessore non superiore ai 2 mm. In questo modo si formano degli spazi tra i dischi dello stesso spessore, entro i quali il liquido torbido risale verso il centro della centrifuga. Le frazioni di liquido pesante per effetto della forza centrifuga escono dalla parte bassa ed esterna dei dischi, lambendo la faccia inferiore del disco immediatamente superiore. Le particelle pesanti si raccolgono nella camera dei fanghi situata perifericamente. Tale camera, di forma biconica, è il risultato di due tamburi o boli, uno superiore e uno inferiore, entrambi conici che vanno a costituire la superficie di chiusura del complesso rotante. Le frazioni di liquido leggero, soggette a minor forza centrifuga, non potendosi scaricare verso l'esterno dei dischi, perché impedito dalla presenza del liquido pesante, a

causa della pressione centrifuga salgono verso il centro dei dischi scorrendo su di essi. I due liquidi scorrono pertanto in senso opposto ed è così possibile separarli.

I dischi fungono da superficie di sedimentazione e grazie alla loro inclinazione si auto puliscono consentendo lo scivolamento della feccia nella camera dei fanghi.

Durante il funzionamento della centrifuga i fanghi si accumulano sempre di più e bisogna eliminarli dalla camera. Tale operazione viene eseguita tramite dei fori che sono chiusi in fase di lavoro e si aprono in fase di scarico dei solidi. Il sistema di apertura e di chiusura dei fori costa essenzialmente di un doppio fondo mobile che si trova in posizione alta in fase di chiusura e si sposta in posizione bassa in fase di apertura. Il movimento del doppio fondo è dovuto ad un sistema idraulico che esercita una pressione verso l'alto in fase di chiusura e una pressione verso il basso in fase di apertura. Un gioco di valvole a comando manuale o automatico immette il liquido di servizio negli spazi appositi e lo scarica da questi per attuare il sistema.

Lo scarico dei solidi può essere parziale o totale. Nel primo caso il doppio fondo mobile si richiude quando ancora i solidi non si sono scaricati completamente. Quando è totale, invece, il doppio fondo rimane aperto abbastanza a lungo da far uscire tutti i solidi e anche una parte dei liquidi. Con lo scarico parziale dei solidi non si ha perdita di liquidi, ma la chiusura rischia di determinare un'usura del sistema di chiusura dei fori. Nello scarico totale dei solidi, invece, si ha la perdita dei liquidi. La soluzione migliore consiste nell'intercalare una serie di aperture parziali con un'apertura totale.

Il comando di apertura e chiusura dei fori può essere attuato da:

- un sistema a tempo: che regola gli intervalli tra un'apertura e un'altra;
- un sistema a misura di torbidità: una fotocellula sulla condotta del liquido chiarificato rileva la presenza di torbidità quando la camera dei fanghi è piena e comanda l'apertura dei fori;
- un sistema idraulico sensibile a variazioni di pressione: in pratica una piccola frazione di liquido chiarificato viene rinvia nella camera dei fanghi attraverso una piccola condotta. Un manometro di precisione misura la pressione necessaria a questo flusso. Quando la camera dei fanghi è piena la piccola condotta si occlude e la pressione di mandata del fluido aumenta. Tale aumento di pressione comanda l'apertura dei fori e lo scarico dei solidi.

Vi sono centrifughe decantatrici a scarico continuo dei sedimenti, nei quali i fori sono sempre aperti. Esse sono utilizzate per concentrare sospensioni di materiali pregiati (amido, lieviti) eliminando gran parte del liquido.

Per quanto riguarda lo scarico del liquido chiarificato, in quasi tutte le centrifughe, esso avviene per mezzo di un dispositivo che trasmette al fluido una notevole energia e fa funzionare la centrifuga come una vera e propria pompa. Ciò consente l'invio del liquido chiarificato ad un serbatoio di stoccaggio o ad un'altra macchina del processo. Si tratta di un semplice disco solidale con il canale di alimentazione della sospensione e internamente cavo con particolare alettatura a spirale. In questo disco l'energia cinetica posseduta dal fluido per effetto del moto di rotazione si trasforma in energia potenziale.

Un inconveniente delle centrifughe a dischi è dovuto al fatto che nell'impiego su liquidi alimentari determinano, a causa della violenta azione meccanica sviluppata dagli organi sul liquido, deterioramento delle caratteristiche meccaniche del fluido, riscaldamento e intima miscelazione di aria ambiente, con conseguente elevata diffusione di ossigeno nel liquido alimentare. Ciò è in contrasto con l'attuale sempre maggiore attenzione dei consumatori alla qualità merceologica dei prodotti alimentari, con un concetto di genuinità che collega il prodotto consumato al prodotto originario, che ha determinato una spinta e riesaminare i processi produttivi e le macchine impiegate nell'industria alimentare con una prospettiva che tiene conto della produttività, ma che punta prevalentemente al mantenimento di tutte le caratteristiche chimico fisiche del prodotto alimentare originale, senza determinare variazioni nella composizione dell'alimento trattato.

Oltre alle centrifughe a dischi sopra discusse, sono note anche le cosiddette "supercentrifughe". Si tratta di centrifughe con cesti di 10 cm di diametro, lunghi 1-2 m e muniti di piccoli diaframmi longitudinali perché il liquido possa raggiungere più rapidamente la stessa velocità del cesto. Questo ruota a circa 60000 giri/min, ma quando si debbano superare soluzioni colloidali o rompere emulsioni la velocità può raggiungere 100000 giri/min. In quest'ultimo caso, l'organo motore è per lo più simile ad una piccola turbina ad aria. Affinché il componente di peso specifico maggiore abbia il tempo di portarsi sulle pareti, si fa giungere la miscela dal basso e i due componenti separati vengono fatti uscire dall'alto dopo un percorso piuttosto lungo. Dal sito più lontano dall'albero vi è l'uscita del liquido più denso. Le supercentrifughe trovano applicazione nelle industrie degli oli minerali e vegetali, dei vini e dei liquori; presentano il vantaggio di ridurre notevolmente il tempo di separazione, rispetto ad una centrifuga normale.

Come le centrifughe a dischi, anche le supercentrifughe presentano il sopramenzionato inconveniente legato allo scarico dei solidi e l'inconveniente di causare un deterioramento delle caratteristiche meccaniche del fluido, riscaldamento e intima miscelazione di aria ambiente, con conseguente elevata diffusione di ossigeno nel liquido alimentare.

La ricerca sviluppata nell'ultimo trentennio, attraverso lo studio fluidodinamico delle centrifughe orizzontali (decanter) ha avuto come obiettivo fondamentale il miglioramento delle rese attraverso la costruzione di macchine sempre più efficienti ed affidabili. Tutto ciò non è sufficiente, in quanto è necessario rivisitare tutto il processo, nelle sue singole fasi operative e nel suo insieme, al fine di massimizzare la qualità nutrizionale e sensoriale, e nel contempo incrementare il contenuto in componenti minori. Da diversi anni si è posto l'interrogativo sull'influenza del passaggio forzoso del mosto oleoso nella centrifuga verticale e sull'effetto che l'alta velocità di rotazione può determinare sulla qualità dell'olio e sulla quantità di ossigeno che in esso si scioglie, a seguito dell'alta pressione generata dalla forza centrifuga (9).

In un lavoro svolto da Masella et al. (10) è stata valutata l'influenza delle centrifughe verticali sulla qualità dell'olio extra-vergine di oliva. I campioni di olio sono stati analizzati prima e dopo il trattamento in centrifuga; dai risultati conseguiti emerge che il trattamento determina importanti variazioni di alcuni aspetti qualitativi dell'olio di oliva. Subito dopo il trattamento in centrifuga è stato rilevato un aumento della concentrazione dell'ossigeno disciolto, inoltre si è riscontrato un aumento significativo del contenuto di perossidi e dell'indice spettrofotometrico K232, rispettivamente del 40 e 14%. Significative differenze si sono avute solo per i fenoli semplici, mentre

per i secoiridoidi, la classe più importante di polifenoli, non si sono riscontrate differenze significative tra prima e dopo il trattamento. Differenze significative si sono riscontrate anche per il contenuto di componenti volatili che risultano essere significativamente superiori per i campioni analizzati prima del trattamento con la centrifuga verticale. Tali oli presentano, infatti, note fruttate più marcate. Questo lavoro suggerisce la necessità di un'adeguata progettazione di separatori liquido-liquido in modo da ridurre il contenuto di ossigeno disciolto al fine di contenere la degradazione delle componenti funzionali per la stabilità dell'olio e per la salute dei consumatori.

### Parametri qualitativi dell'olio d'oliva

In base al livello qualitativo, identificato da parametri chimici (acidità; numero di perossidi; costanti spettrofotometriche ed etil esteri degli acidi grassi) ed organolettici (Valutazione organolettica) come definiti dall'allegato I del Reg. UE 2016/2095, gli oli di oliva vergini sono classificati in:

- Olio extra vergine di oliva
- Olio di oliva vergine
- Olio di oliva lampante

**Tab. 1. Classificazione degli oli in base ai parametri chimici**

Categoria	Acidità (%)	N° di Perossidi (mg O <sub>2</sub> /kg)	Esteri etilici di acidi grassi (mg/kg)	Spettrofotometria			Valutazione organolettica	
				K232	K270	Δ K	mediana Fruttato	mediana Difetto
Olio Extra Vergine di Oliva	≤ 0.8	≤ 20	≤ 35	≤ 2.5	≤ 0.22	≤ 0.01	> 0	= 0
Olio di Oliva Vergine	≤ 2.0	≤ 20	-	≤ 2,6	≤ 0.25	≤ 0.01	> 0	≤ 3,5
Olio di Oliva Lampante	>2.0	-	-	-	-	-	-	> 3.5*

### Acidità libera dell'olio

L'acidità misura, a seguito della lipolisi, la formazione di acidi grassi liberi. La lipolisi è una reazione di idrolisi che interessa la struttura dei trigliceridi e consiste nella rottura di un legame tra il glicerolo ed uno o più acidi grassi ad esso esterificati. Avviene ad opera di un enzima presente nella polpa delle olive, la lipasi in presenza di acqua. La misura dell'acidità è sicuramente il primo indice della qualità del prodotto in quanto è direttamente determinato dalla qualità delle olive in termini di integrità del frutto al momento della trasformazione. Fattori che influiscono sull'acidità libera dell'olio:

- grado di maturazione delle olive;
- stato fitosanitario delle olive;
- tempi di stoccaggio delle olive

Anche un prolungato contatto tra olio e acqua di vegetazione e/o morchie può determinare un innalzamento dell'acidità libera dell'olio.

### ***Numero di perossidi***

Questo parametro misura l'ossidazione primaria dell'olio, quindi la formazione di idroperossidi per effetto della reazione tra acidi grassi insaturi e ossigeno in presenza di catalizzatori (calore; metalli; luce). Il valore assume significati diversi a seconda dei momenti della vita di un olio:

- In un olio fresco misura il livello di ossidazione dovuto alle operazioni di raccolta stoccaggio e conservazione delle olive, fornendo un'indicazione sulla qualità della materia prima impiegata;
- In conservazione misura l'accumulo di perossidi a seguito di fenomeni di ossidazione favoriti dalla presenza di aria e catalizzati da: calore, luce e metalli.

Il numero di perossidi tende tuttavia ad aumentare durante la fase di conservazione dell'olio per la lenta, ma progressiva azione dei fattori che favoriscono l'ossidazione radicalica.

### ***Costanti spettrofotometriche***

Il numero di perossidi non è sufficiente a definire lo stato di ossidazione dell'olio in quanto durante la conservazione questo parametro può subire una diminuzione a seguito della decomposizione degli idroperossidi stessi (ossidazione secondaria) con formazione di aldeidi e chetoni e acidi volatili responsabili del difetto di rancido. Gli assorbimenti alle lunghezze d'onda 232 nm e 270 nm indicano lo stato ossidativo dell'olio, poiché si possono formare sistemi dienici e trienici coniugati in seguito all'ossidazione dell'olio. L'ossidazione primaria, che comporta la formazione degli idroperossidi, fa aumentare l'assorbimento a 232 nm. L'ossidazione secondaria, con formazione di composti carbonilici secondari, determina un aumento a 270 nm.

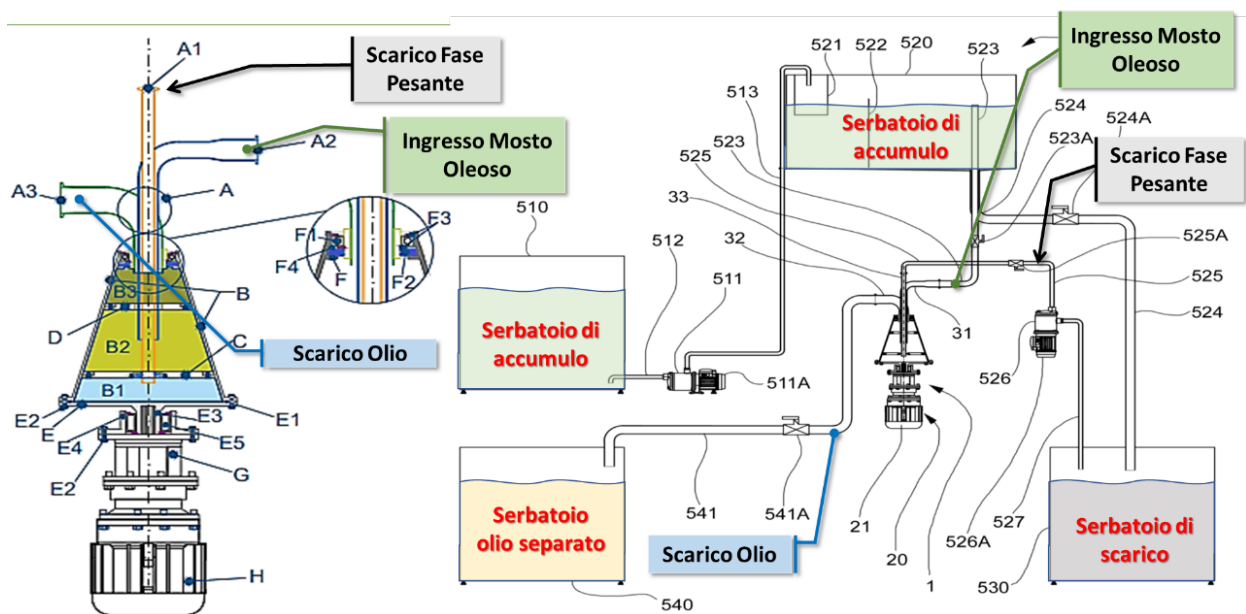
### **Attività sperimentali**

Le attività sperimentali sono state condotte lungo quattro stagioni olearie (2019-2022) ed hanno avuto come obiettivo il miglioramento della qualità dell'olio attraverso approcci di tipo impiantistico. La ricerca ha avuto come macro obiettivi: (i) la costruzione e il brevetto di un separatore centrifugo olio/acqua/morchia operante a bassi giri (Rotased) per migliorare la qualità finale dell'olio e (ii) lo sviluppo di un nuovo sistema di separazione in atmosfera controllata, al fine di salvaguardare dall'ossidazione l'EVOO e di creare le condizioni ottimali per massimizzare la stabilità ossidativa delle componenti nutraceutiche e massimizzare la qualità finale complessiva dell'olio, rispetto ai parametri merceologici (11, 12). Le attività sono state condotte in sinergia con i partner aziendali del progetto con approcci dipendenti dal tipo di attività, come descritto in seguito. Per la messa a punto del Rotased le prove sono state condotte presso l'oleificio Ruscigno (Tricarico, MT), dove la macchina stata installata a valle della linea di estrazione ed ha operato sotto diverse condizioni, con l'obiettivo di definire le condizioni di massima per ottimizzare la qualità del prodotto finale. Le attività successive hanno previsto l'estrazione del mosto oleoso in oleificio (Ruscigno; Picciariello (Bitonto, BA)), il trasporto presso i laboratori dell'Università e l'inoculo con una coltura aggiuntiva (batteri e/o lieviti) selezionata dal gruppo di Microbiologia Industriale dell'Università

degli Studi della Basilicata. Il mosto oleoso inoculato (ed il controllo non inoculato), in seguito ad incubazione per 16h, è stato quindi trattato con un separatore centrifugo a dischi, operante in atmosfera controllata, per eliminare l'acqua e i solidi residui.

**Progettazione, costruzione e brevetto di un separatore olio/acqua/morchia per migliorare la qualità finale di EVOO.**

Il separatore centrifugo "ROTASED" messo a punto dal gruppo di Macchine ed Impianti per le Industrie Alimentari è di fatto un sedimentatore rotativo. Lo scopo della macchina è quello di mettere a disposizione una sedimentazione rotativa per la separazione solido/liquido e liquido/liquido di liquidi alimentari che sia in grado di ovviare o ridurre almeno in parte gli inconvenienti sopra discussi. L'invenzione sarà meglio compresa dalla seguente descrizione dettagliata di sue forme di esecuzione.



**Fig. 4. Sezione dettagliata del ROTASED (a sinistra) e dell'impianto di separazione completo (a destra).**

Facendo inizialmente riferimento alla Fig. 4, in tale figura è mostrato uno schema dell'impianto per la separazione solido/liquido e liquido/liquido di liquidi alimentari secondo una prima forma di realizzazione attualmente preferita. L'impianto di separazione comprende un sedimentatore rotativo in accordo ad una prima forma di realizzazione preferita. Il separatore è in particolare un sedimentatore rotativo ad asse verticale per la separazione solido/liquido e liquido/liquido di liquidi alimentari. In altre parole il sedimentatore rotativo è adatto a chiarificare sia una torbida (vale a dire un liquido da chiarificare) costituita da o comprendente ad esempio due liquidi insolubili di diversa densità sia una torbida costituita da o comprendente ad esempio un liquido e solidi. Come è noto con il termine "torbida" si intende un materiale allo stato liquido che comprende o è composto o da almeno due liquidi insolubili fra loro o da almeno un liquido e solidi che sono insolubili fra loro. L'impianto di separazione, comprende un serbatoio (510) per la torbida, una pompa (511) di alimentazione della torbida, una tubazione di prelievo (512) della torbida operativamente interposta fra la pompa 511 ed il serbatoio 510. L'impianto di separazione 500 comprende una tubazione di mandata (513) della torbida operativamente interposta fra la pompa

511 ed una vasca (520), o serbatoio di accumulo, che ha la funzione di serbatoio di accumulo di alimentazione per il sedimentatore rotativo. Il serbatoio di accumulo 520 comprende una griglia 521 a cestello ed un setto di separazione (522) disposto all'interno del serbatoio di accumulo (520). Una tubazione (523-31), di immissione della torbida, è operativamente interposta fra il serbatoio di accumulo 520 ed il sedimentatore rotativo. La torbida immessa nel sedimentatore comprende o è costituita da una prima frazione di torbida a minore densità (che corrisponde ad un liquido chiarificato destinato ad essere scaricato dal sedimentatore) ed una seconda frazione di torbida a maggiore densità rispetto alla densità della prima frazione di torbida.

Una tubazione di scarico 541-32 per scaricare un liquido chiarificato dal sedimentatore è operativamente interposta fra il sedimentatore rotativo ed una vasca di scarico (540) prevista per ricevere il liquido chiarificato. Si osservi che tale liquido chiarificato corrisponde alla suddetta prima frazione di torbida a minore densità della torbida immessa nel sedimentatore.

Una tubazione 525-33 di prelievo per prelevare la suddetta seconda frazione di torbida dal sedimentatore rotativo è operativamente interposta fra il sedimentatore rotativo e una pompa di prelievo (526). In particolare, la seconda frazione di torbida corrisponde in pratica alla frazione di torbida a maggiore densità che viene separata nel sedimentatore 1.

Le pompe 511 e 526 ed il sedimentatore rotativo sono provvisti ciascuno di una rispettiva unità di azionamento (511A, 526A, 20). Le unità di azionamento 511A, 526A delle pompe 511 e 526 comprendono rispettivi motori elettrici 511A e 526A. L'unità di azionamento 20 del sedimentatore rotativo 1 comprende un motore elettrico (21). In accordo ad una forma di realizzazione preferita, i motori elettrici sono operativamente connessi ad un quadro elettrico e sono controllati singolarmente da un inverter per la regolazione della velocità di rotazione di tali motori.

Per evitare il maltrattamento determinato dall'elevata velocità di rotazione della centrifuga a dischi e, per offrire agli operatori la possibilità di controllare il livello di chiarificazione desiderato, il Rotased agisce operando una sedimentazione per gravità, che viene migliorata tramite l'applicazione di un opportuno campo di accelerazione centrifuga alla miscela da separare.

Il principio fisico su cui si basa è la sedimentazione in regime laminare.

Operando a un numero o fattore "g" sensibilmente più basso ( $6 \times g$ ) rispetto alle centrifughe normalmente utilizzate ( $5000 \times g$ ), l'innovazione si pone come soluzione intermedia tra la sedimentazione naturale, generalmente considerata troppo lenta e poco efficace, e la sedimentazione eseguita con centrifughe a dischi estremamente efficace ma, meno "rispettosa" delle caratteristiche nutrizionali e organolettiche. Questa separazione consente di produrre una percentuale di olio di qualità, che oscilla dal 50% al 90% del mosto oleoso trattato, senza provocare ossigenazione, riscaldamento e omogeneizzazione del prodotto.

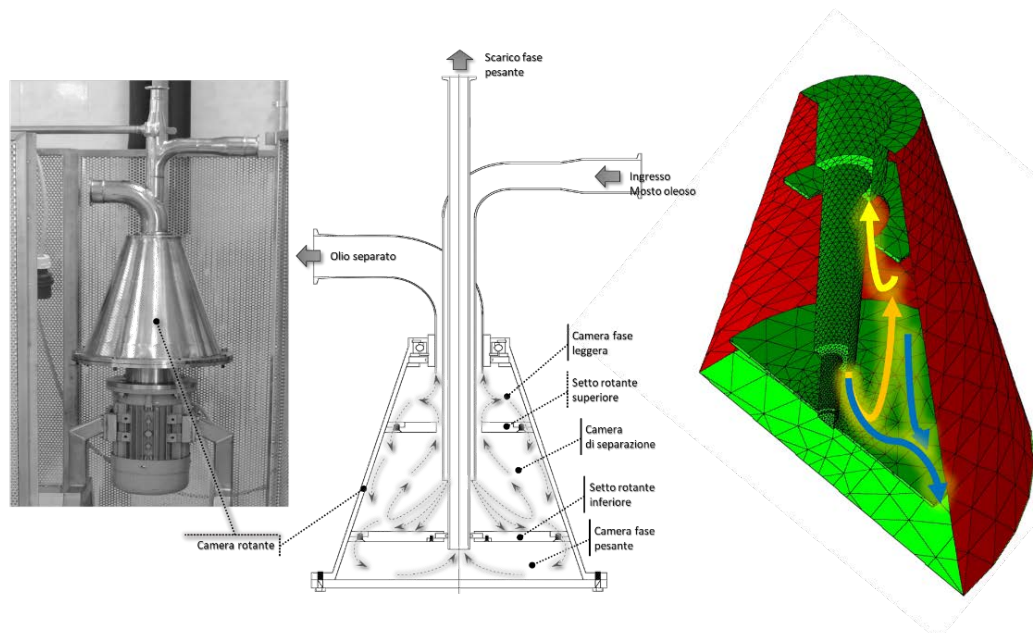
Una saracinesca permette la regolazione dell'ingresso e quindi del tempo di residenza del prodotto all'interno della macchina.

L'innovazione, rispetto alla pura sedimentazione per gravità, consiste nel miglioramento o aiuto alla sedimentazione ottenuta imponendo un'opportuna velocità di rotazione che, sempre in un campo fluidodinamico laminare, sommandosi all'accelerazione di gravità (questo è stato

progettato che avvenga a circa 100 RPM), genera dei vettori di accelerazione che sono paralleli alla superficie laterale del tronco di cono solo nella sua parte superiore (Fig. 5), in modo da creare un moto interno che trascina la fase leggera predominante verso lo scarico superiore, e allo stesso tempo, le fasi più pesanti verso lo scarico inferiore, con ulteriore separazione della fase leggera che viene spinta verso l'asse di rotazione e costretta quindi a risalire verso lo scarico superiore della fase leggera.

Innovativo risulta anche il sistema di alimentazione per la gestione autonoma del tempo di ritenzione del prodotto nella macchina, infatti le portate di alimentazione e di scarico della fase leggera, viene attuata tramite una pompa di ripescaggio della fase pesante sedimentata.

L'opportuna regolazione di quest'ultima consente di regolare la portata di liquido leggero separato che avviene per sfioramento dalla parte superiore del tronco di cono, mentre l'immissione del prodotto avviene per gravità da un serbatoio posto superiormente alla macchina stessa.



**Fig. 5. Foto del ROTASED e dettaglio dei vettori di accelerazione generati in fase di funzionamento e ricostruzione 3D della camera interna del sedimentatore.**

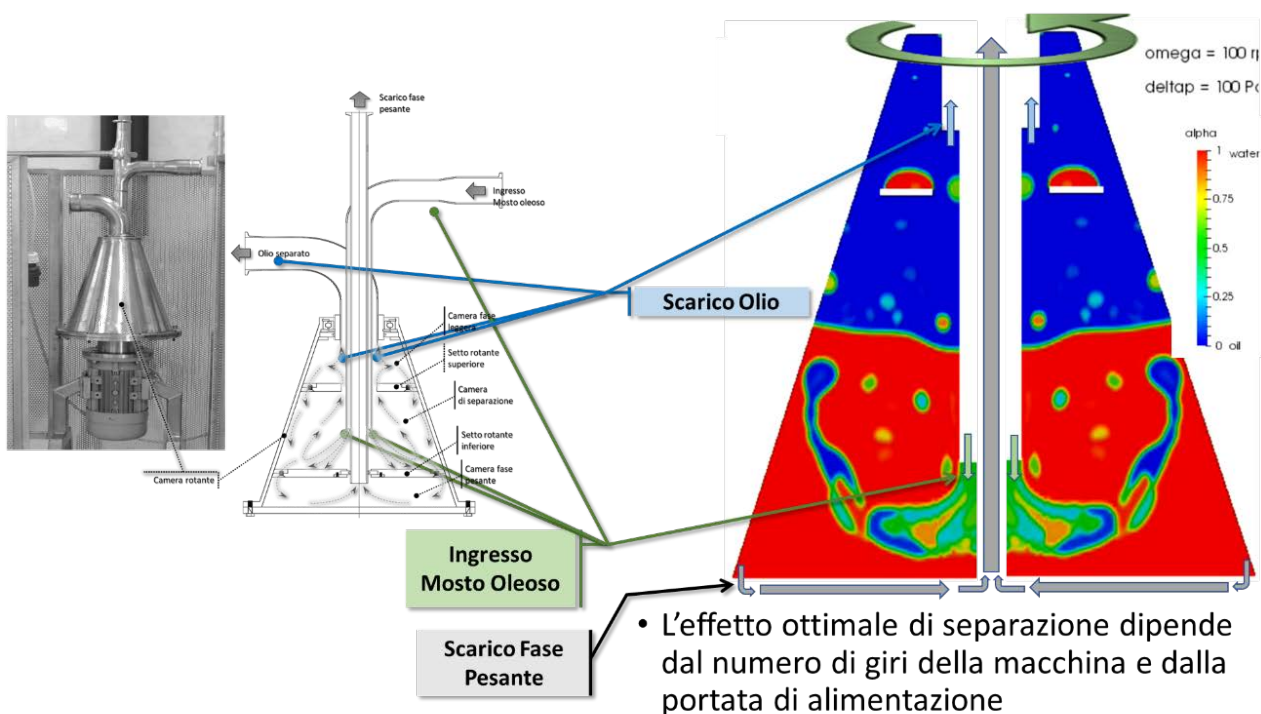
Preliminarmente è stata condotta una simulazione fluido-dinamica del funzionamento del prototipo utilizzando OpenFoam, un software open-source (Fig. 6).

È stata condotta una simulazione fluido-dinamica del funzionamento del prototipo stesso utilizzando OpenFoam, un software open-source per la simulazione fluidodinamica e multifisica. Si è eseguita la simulazione di un flusso 2D incomprimibile bifase, con rotazione e forza di gravità. Si è utilizzato un modello di turbolenza di tipo k-epsilon SST che ben si presta a descrivere regimi fluttuanti da laminare a turbolenti, anche se i casi test d'interesse sono laminari. In particolare sono privilegiati i funzionamenti in regime laminare per evitare rimescolamenti tra le fasi, e per avere una ottimale separazione delle stesse. Il flusso bifase è risolto attraverso un modello VOF (Volume Of Fluid). Esso caratterizza il flusso bifase attraverso le equazioni di Navier-Stokes scritte per la miscela, e risolvendo una nuova equazione per la frazione di volume (alpha) che descrive il grado di presenza delle due fasi in un determinato volumetto.

Dalla simulazione si denota:

- la corretta separazione delle due fasi olio(blue) + acqua (rosso);
- che la fase leggera (olio) viene accumulata e scaricata dalla parte superiore della macchina, mentre la fase pesante (acqua) viene trasferita nella parte inferiore;
- che la separazione viene agevolata dalla velocità di circa 100 rpm che induce una limitata forza centrifuga sul prodotto, accelerandone la separazione;
- che il moto permane laminare e non si riscontrano rimescolamenti con l'ossigeno contenuto nell'aria, in tal modo viene preservata intatta la qualità del prodotto iniziale.

La simulazione fluido-dinamica ha mostrato e chiarito come un aumento della portata generi differenti regimi di flusso all'interno della centrifuga, ma non riesce da solo a rendere selettivi i due outlet per le due differenti fasi.



**Fig. 6. Simulazione fluidodinamica condotta con OpenFoam**

### ***Prove sperimentali condotte con ROTASED***

Nel corso del primo anno di attività (2019), sono state svolte le prove sperimentali di confronto dei trattamenti del Rotased con la cv. Coratina presso l'oleificio Ruscigno di Tricarico (MT) (Fig. 7).

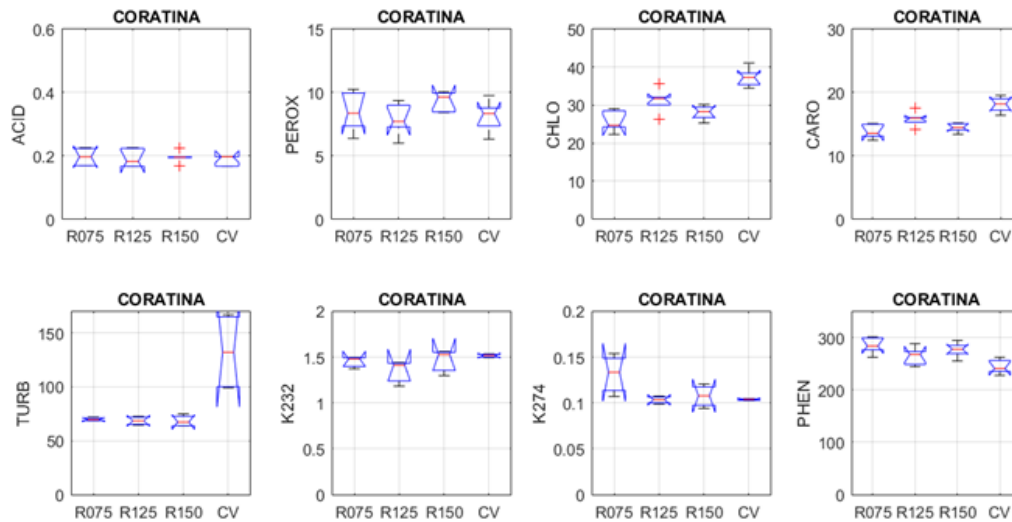
È stato valutato l'utilizzo del prototipo sperimentale (Rotased) per la separazione liquido-liquido con l'obiettivo di definire i criteri progettuali per la realizzazione di un prototipo di impianto per la separazione dell'olio di oliva dal mosto oleoso in uscita dal decanter, al fine di eliminare gran parte dell'acqua residua senza ricorrere al separatore centrifugo. Durante le prove sono state testate 3 condizioni operative, ovvero velocità di rotazione (75, 125, 150 rpm). Gli oli sperimentali ottenuti sono stati analizzati rispetto ai principali parametri commerciali (acidità, numero di

perossidi, indici spettrofotometrici K232 e K270) impiegando le metodiche ufficiali (11) e rispetto a criteri di qualità (polifenoli, carotenoidi, clorofilla, torbidità).

Il grado di maturazione delle olive Coratina utilizzate durante il test è stato di circa 60% verde e del 40% nero (Fig. 7), considerato un livello di maturazione ottimale per in relazione alla qualità dell'olio e al tasso di estrazione. In Fig. 8 sono rappresentati graficamente i risultati ottenuti dalle analisi dei campioni della cv. Coratina.



**Fig. 7. In alto, foto delle impiegate nella sperimentazione. In basso foto dell'impianto di separazione installato in oleificio.**



**Fig. 8. Risultati analisi della cv. Coratina.**

Dai risultati ottenuti il primo dato più importante è che tutti gli oli avevano i requisiti chimici minimi per essere categorizzati come extra vergini, tuttavia si sono osservati trend caratteristici per ogni parametro investigato. Il valore dell'acidità nei campioni sperimentali e nel controllo (CV) era molto basso (circa 0,2%), e non statisticamente differente tra i campioni. Il numero di perossidi era più basso nei campioni estratti impiegando il Rotased 125 rpm (7,71 mEq O<sub>2</sub>/kg), mentre il valore di carotenoidi e clorofille era più basso nei campioni sperimentali. Dai dati tal quali non si evince quale possa essere il trattamento migliore. È necessario considerare le variazioni relative percentuali rispetto ad un riferimento, il riferimento scelto è l'azione svolta dalla centrifuga verticale CV. Inoltre, per decidere sul trattamento migliore, è necessario scegliere un obiettivo, l'obiettivo scelto è lo stato di ossidazione complessivo del prodotto. Questo obiettivo è misurato dai 4 parametri ACID, PEROX, K270 e K232. Pertanto, la media dei 4 parametri (cambiata di segno) è stata usata per valutare lo stato di ossidazione. Un punteggio positivo indica uno stato di ossidazione basso mentre un punteggio negativo indica uno stato di ossidazione elevato (Tabella 2).

**Tab. 2. Variazioni relative percentuali dei parametri chimici rispetto alla centrifuga verticale.**

Coratina	R075	R125	R150	CV
ACID < 0.8	0.0%	-10.0%	0.0%	0.0%
PEROX < 20	0.2%	-7.6%	15.5%	0.0%
CHLO	-33.8%	-14.9%	-24.2%	0.0%
CARO	-25.4%	-12.3%	-20.5%	0.0%
TURB	-47.3%	-48.1%	-49.0%	0.0%
K232 < 2.5	-2.6%	-7.2%	0.7%	0.0%
K270 < 0.22	30.0%	0.0%	10.0%	0.0%
PHEN	17.8%	11.1%	15.2%	0.0%
<b>PUNTEGGIO</b>	↓ -6.9	↑ 6.2	↓ -6.5	

Con queste premesse si denota che R125 (Rotased a 125 rpm) ha un punteggio di +6,2 e rappresenta il trattamento migliore. In questo caso si osservano una diminuzione del 10%

dell'acidità, una diminuzione del'8% dei perossidi, una diminuzione del 7% di K232 ed un aumento dell'11% dei polifenoli totali. Gli oli sperimentali avevano un profilo fenolico più ricco dei campioni sperimentali, con un incremento relativo % rispetto a CV tra l'11,1% (125 rpm) e il 17,8% (75 rpm).



**Fig. 9. Cv. Coratina – Confronto tra le due estrazioni olearie. Olio ottenuto con Centrifuga verticale; (b) Olio ottenuto con Rotased.**

I dati sperimentali ottenuti con l'innovativo separatore Rotased, utilizzato per la pulizia finale del mosto oleoso prima del suo successivo imbottigliamento, evidenziano l'efficacia dello stesso nella pulizia dell'olio e la possibilità di sostituire i tradizionali separatori centrifughi ad asse verticale che vengono normalmente utilizzati nella fase di pulizia finale dell'olio. Tuttavia, a differenza di questi ultimi, il Rotased evita un'eccessiva ossigenazione e genera un minor riscaldamento dell'olio, originati dalle macchine in fase di separazione. Inoltre, il Rotased conserva le più importanti proprietà sensoriali e nutrizionali di un olio Extra-Vergine d'oliva. Complessivamente, le evidenze raccolte rappresentano una base di partenza per l'allestimento dell'impianto da utilizzare a livello industriale per la produzione di un olio extravergine di oliva "torbido".

Anche a seguito dei risultati ottenuti in queste prove, il Rotased ha ricevuto l'attestazione di brevetto per invenzione industriale dal Ministero dello Sviluppo Economico – Ufficio Italiano Brevetti in data 28/01/2019 con il numero 102016000078140.

Rotased può sostituire i tradizionali separatori nella pulizia dell'olio consentendo un notevole risparmio in termini di energia elettrica (1,1 kW), evita un'eccessiva ossigenazione e genera un minor riscaldamento dell'olio, conserva le più importanti proprietà sensoriali e nutrizionali di un olio Extra-Vergine d'oliva.

### **Separazione con prototipo di separatore in atmosfera modificata a bassi giri (SAM)**

#### **Attività 2020**

Le attività in questa fase hanno investigato l'effetto della variazione della velocità di rotazione (1000 rpm) e dell'atmosfera nello spazio di testa della centrifuga verticale a dischi. La centrifuga a dischi a bassi giri sperimentale che è stata impiegata è parte integrata di un mini-

impianto di estrazione in discontinuo in dotazione presso i laboratori della Scuola di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (SAFE) dell'Università degli Studi della Basilicata.

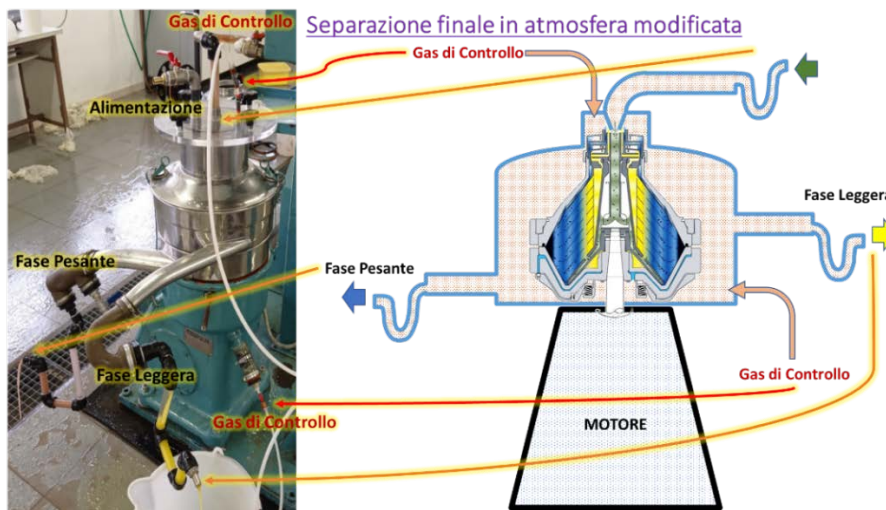


Fig. 10. Foto e schema della centrifuga in fase operativa.

Pertanto, in via generale, l'approccio sperimentale ha previsto la seguente serie di fasi comuni (Fig. 11): (i) approvvigionamento del mosto oleoso dagli oleifici partner; (ii) trasporto presso i laboratori SAFE; (iii) inoculo over night (12h) del mosto oleoso impiegando i microrganismi selezionati dal gruppo di Microbiologia Industriale; (iv) separazione dell'olio con centrifuga verticale a dischi a bassi giri (1000 rpm) in atmosfera modificata. La centrifuga è stata opportunamente modificata per consentirne, in fase di estrazione, il condizionamento con 100% azoto (N<sub>2</sub>) o in assenza di aria in ingresso (i.e. pressione parziale dell'ossigeno <20k Pa).

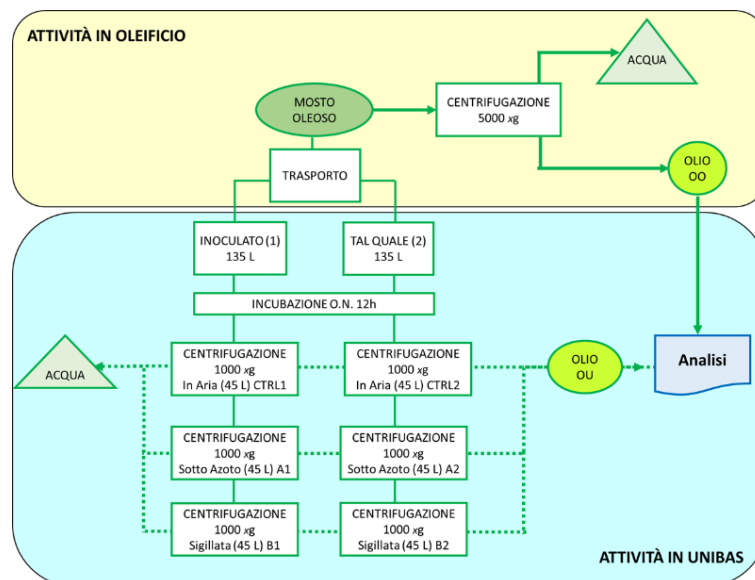


Fig. 11. Schematizzazione dell'attività sperimentale.

In questa attività le prove sono state condotte sulle cv. Coratina e Leccino, lungo diverse stagioni. L'olio estratto in aria (Ctrl) è stato usato come riferimento per valutare l'efficacia dell'estrazione in atmosfera modificata, mentre l'olio estratto con l'impiego della centrifuga

convenzionale a dischi in oleificio (RIF) è stato usato come controllo per verificare l'effetto della velocità di rotazione in aria. La qualità dell'olio ottenuto è stata valutata in prima istanza determinando i parametri di commerciabilità rispetto ad un olio extra vergine, quali acidità (%), numero di perossidi (mEq O<sub>2</sub>/kg di olio) e gli indici spettrofotometrici (K232 e K270), dopo 24 h e 180 e 360 giorni dall'estrazione, impiegando le metodiche analitiche ufficiali (11). In secondo luogo, per confrontare i trattamenti è stato attribuito un punteggio di qualità ad ogni campione ottenuto da ogni trattamento. I valori analitici sono stati trasformati in valori percentuali rispetto al valore massimo di legge per un olio extra vergine d'oliva (Acidità<0,8%, Perossidi<20 mEq O<sub>2</sub>/kg; K232<2,5; K270<0,22). Il livello qualità degli oli, quindi, è stato calcolato come media dei valori percentuali di tali parametri.

Pertanto, seguendo questo approccio metodologico, nel secondo anno di attività (2020) è stato possibile assegnare un punteggio ai campioni di olio estratto dal mosto oleoso di cultivar Coratina e Leccino, approvvigionato presso il frantoio Ruscigno (Fig. 12). I dati suggeriscono come al tempo 0, per entrambe le cultivar, gli oli ottenuti dal punto di vista chimico possono essere categorizzati come extra vergini (0,17%<Acidità<0,24%; 5,69 mEq O<sub>2</sub>/kg<Perossidi<9,05 mEq O<sub>2</sub>/kg; 0,86<K232<1,10; 0,06<K270<0,12). In particolar modo, come atteso, si evince una macroseparazione dei campioni che avviene secondo caratteristiche dipendenti dalla durata di conservazione, per cui i campioni appena estratti (24h) avevano un punteggio più alto, a seguire quelli estratti a 180 e 360 giorni. L'analisi dei dati denota (Tabella 3), inoltre, come contestualmente al tempo di estrazione, i prodotti con l'inoculo avessero il punteggio più alto, sia nella Coratina (dal 62 al 64%) che nella Leccino (dal 61 al 68%).

**Tab. 3. Punteggi assegnati agli oli della cv. Leccino e Coratina sulla base del livello qualità determinato nelle prove. 1: campioni con inoculo; 2: campioni senza inoculo; A: estrazione sotto flusso di azoto; B: estrazione con la centrifuga sigillata; Ctrl: estrazione condotta in aria.**

TESI	TRATTAMENTO	TEMPO	LQ(%)
1	A	0	68,87
1	Ctrl	0	65,44
1	B	0	61,61
2	Ctrl	0	61,32
2	B	0	60,88
2	A	0	59,63
1	B	180	59,43
1	A	180	58,63
2	Ctrl	180	56,62
2	B	180	55,93
2	A	180	53,31
1	Ctrl	180	48,60
2	RIF	0	46,59
1	B	360	44,94
2	A	360	43,29
1	A	360	42,04
2	Ctrl	360	41,91
2	B	360	39,40
2	RIF	180	36,23
1	Ctrl	360	36,02
2	RIF	360	16,37

**LECCINO**

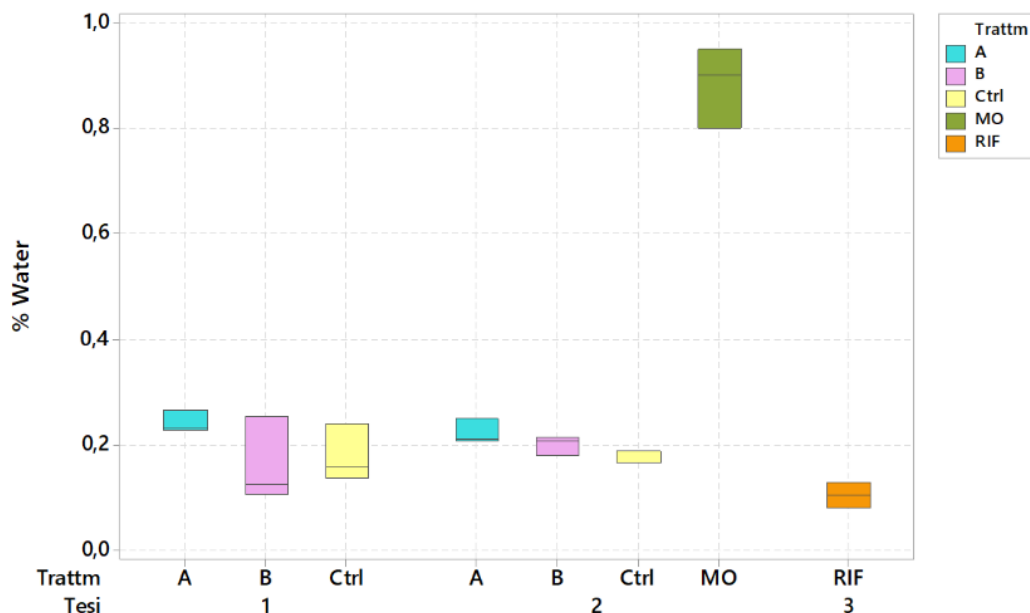
TESI	TRATTAMENTO	TEMPO	LQ (%)
1	B	0	64,20
1	Ctrl	0	62,97
1	A	0	62,45
2	A	0	61,19
2	Ctrl	0	60,37
2	RIF	0	60,23
2	B	0	58,69
1	A	180	58,52
2	Ctrl	180	57,04
2	A	180	52,98
1	Ctrl	180	52,98
2	B	180	52,58
1	B	180	50,81
1	Ctrl	360	39,24
1	A	360	38,37
2	B	360	36,37
2	RIF	180	32,24
1	B	360	31,97
2	Ctrl	360	28,64
2	A	360	18,99
2	RIF	360	17,00

**CORATINA**

È rilevante il punteggio degli oli di riferimento estratti in oleificio (RIF) che per entrambe le cv. è al di sotto degli oli sperimentali, in particolar modo la Leccino (RIF) a 24h dall'estrazione ha un punteggio inferiore (46,59%) rispetto anche agli oli sperimentali conservati per 180 gg; diversamente, la Coratina (RIF) aveva un livello qualitativo decisamente migliore (60%) e simile agli oli sperimentali non inoculati. Le due cv. esprimevano un livello qualitativo dipendente anche dal sistema di estrazione impiegato, suggerendo come vi sia un effetto dell'interazione delle variabili inoculo e condizioni di estrazione.

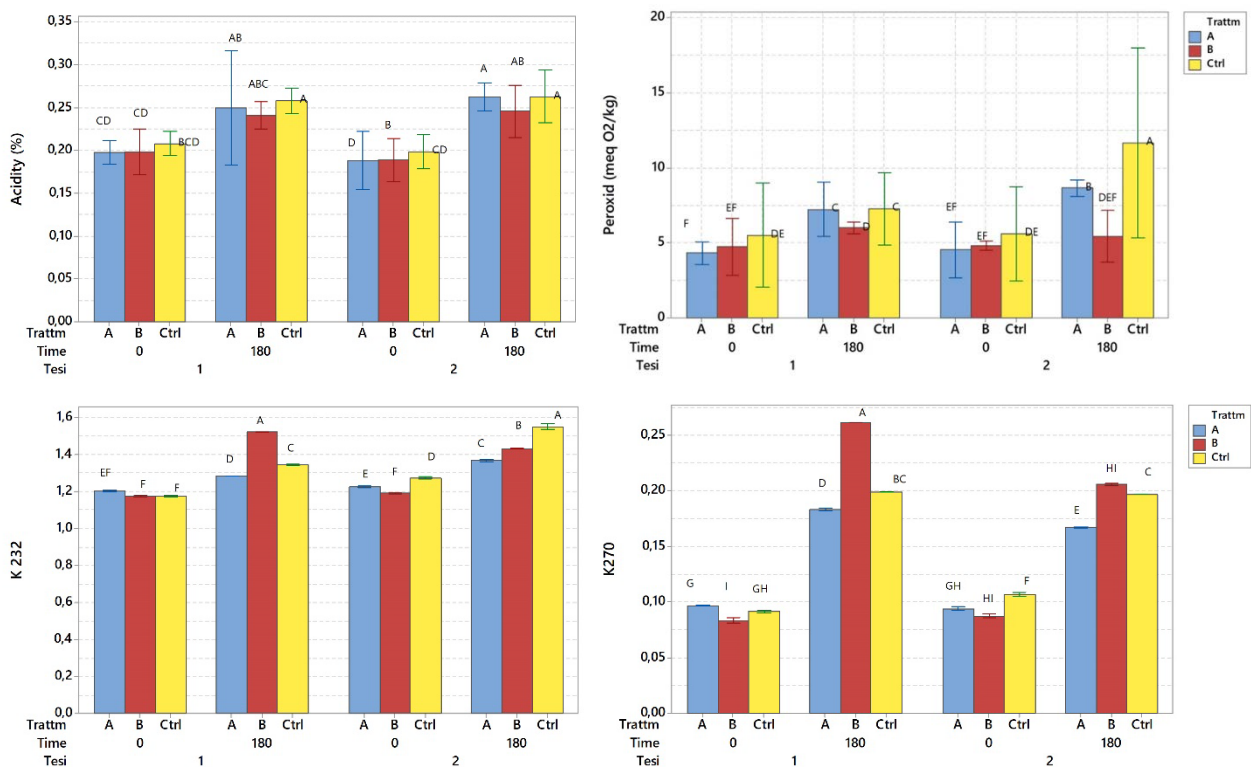
### Attività 2021

Con l'obiettivo di confermare i risultati conseguiti nel 2020, nel terzo anno di attività (2021) si è proceduto a replicare l'approccio investigativo impiegato (i; ii, iii, iv) procedendo alla separazione di un mosto oleoso di cv. Coratina, approvvigionato presso l'oleificio Picciariello presso Bitonto (BA). Inoltre, è stato misurato anche il contenuto di acqua residua negli oli estratti tramite essiccazione in stufa a 105 °C e misurazione del peso fino al raggiungimento della stabilità, per verificarne la corrispondenza rispetto agli standard qualitativi di riferimento (<0,2%). L'acqua residua nel mosto oleoso era molto bassa (0,9%), suggerendo che l'operazione di separazione operata dal decanter a tre fasi in oleificio è stata molto efficace, restituendo un mosto poco idratato. Nonostante ciò, la separazione operata sia in oleificio che nelle prove sperimentali allontanava i residui di acqua, restituendo un prodotto con un residuo massimo dello 0,2%, impiegando la centrifuga sperimentale, fino allo 0,1% quando la separazione era effettuata con la centrifuga a 5000 rpm. Contestualmente agli oli estratti con la centrifuga sperimentale, tra tutti, i prodotti estratti sotto flusso di N<sub>2</sub> (A1; A2) avevano un residuo di acqua sensibilmente più alto (Fig. 12).



**Fig. 12.** Contenuto di acqua residuo (%). 1: campioni con inoculo; 2 campioni senza inoculo; A: estrazione sotto flusso di azoto; B: estrazione con la centrifuga sigillata; Ctrl: estrazione condotta in aria; MO: Mosto oleoso; RIF: separazione con centrifuga convenzionale in oleificio.

Le analisi chimiche hanno rilevato come gli oli rientrassero nella categoria extra vergine, comprovando la buona qualità della materia prima e della procedura di estrazione. Rispetto ai valori di acidità, i quali erano molto bassi (0,2%) e simili all'annata precedente, l'analisi statistica (ANOVA, Tukey HSD) suggeriva che non vi era un effetto dell'inoculo o dei trattamenti su questo parametro, il quale aumentava nel tempo (180gg) in tutti i campioni sperimentali sino a circa 0,25%. Il numero di perossidi presentava un trend molto preciso, dove al tempo 0 non si evidenziava l'effetto dell'inoculo, bensì si osservava una variabilità dovuta all'impiego dell'atmosfera modificata, per cui i prodotti estratti con flusso di N<sub>2</sub> avevano valori significativamente più bassi (4,2 mEq O<sub>2</sub>/kg) di quelli estratti in aria (5,5 mEq O<sub>2</sub>/kg). Dopo 180 gg di conservazione il numero di perossidi aumentava in tutti i campioni, in particolar modo in quelli estratti dal mosto non inoculato o estratti in aria.



**Fig. 13. Risultati delle analisi dei parametri commerciali di base per gli oli sperimentali.**

Per comprendere come i parametri investigati e i campioni fossero correlati è stata condotta un'analisi multivariata attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA). Dall'elaborazione statistica multivariata ottenuta dalla matrice di correlazione dei parametri misurati nei prodotti ad ogni campionamento, si evince come le prime due componenti principali spiegano circa il 78% della varianza tra i campioni, separandoli in base ai trattamenti ed il tempo di conservazione. L'acidità, il numero di perossidi e gli indici spettrofotometrici erano inversamente correlati con il contenuto di clorofilla, carotenoidi e contenuto fenolico totale. Inoltre l'analisi ha consentito graficamente di osservare una macro separazione, sia a 24h che 180gg, dei campioni inoculati da quelli controllo. Il campione di olio estratto in oleificio con la centrifuga convenzionale (5000 rpm) risultava separato dai campioni sperimentali estratti in aria, registrando un numero di perossidi maggiore (6,3 mEq

O<sub>2</sub>/kg) e un contenuto fenolico totale inferiore rispetto agli oli sperimentali, suggerendo come la più alta velocità di rotazione possa inficiare le caratteristiche qualitative, in particolar destabilizzare la componente fenolica.

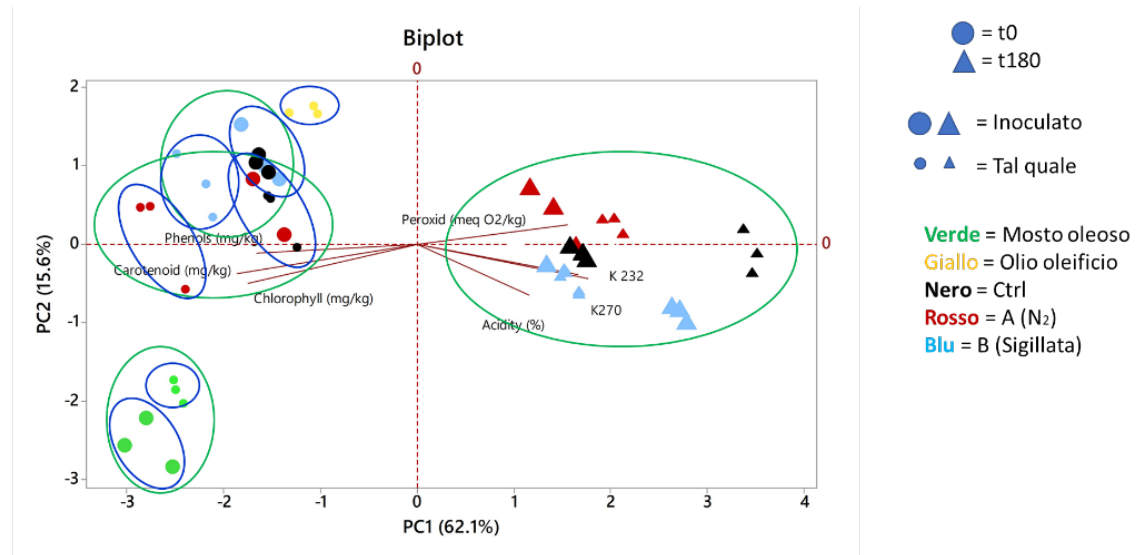


Fig. 14. Biplot (score plot + loading plot) dell'elaborazione statistica multivariata (PCA) ottenuta dalla matrice di correlazione con i parametri misurati e i prodotti ad ogni campionamento.

Tab. 4. Punteggi assegnati agli oli della cv. Coratina sulla base del livello qualità determinato nelle prove. 1: campioni con inoculo; 2 campioni senza inoculo; A: estrazione sotto flusso di azoto; B: estrazione con la centrifuga sigillata; Ctrl: estrazione condotta in aria.

TESI	TRATTAMENTO	TEMPO	LQ (%)
1	B	0	65,25
1	A	0	64,23
1	CTRL	0	63,35
2	B	0	59,22
2	A	0	58,88
2	RIF	0	58,11
2	CTRL	0	53,81
1	A	180	47,34
2	A	180	46,34
2	B	180	45,06
1	B	180	44,99
2	RIF	180	44,62
1	CTRL	180	44,37
2	CTRL	180	36,91

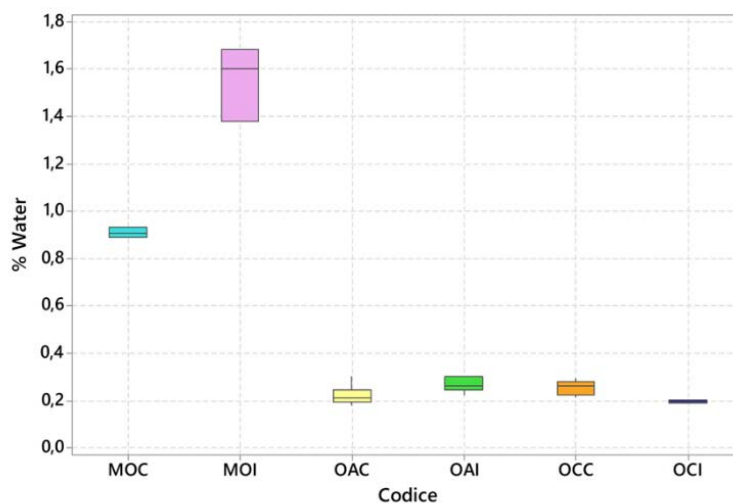
#### CORATINA

L'analisi dei dati integrata (Tabella 4) denota come, contestualmente al tempo di estrazione, i prodotti con l'inoculo avessero il punteggio più alto (dal 63 al 65%) di quelli non inoculati. Un dato interessante che è emerso è relativo al livello qualità% del prodotto non inoculato estratto in aria a

basse velocità (2 Ctrl, tempo 0), che è risultato di circa il 5% inferiore del controllo in oleificio (non inoculato), suggerendo come vi sia un effetto dell'interazione dell'inoculo con la metodologia di estrazione. Lo scarto % dopo 180 giorni di conservazione tra i campioni sperimentali è di circa il 10%, dove i campioni estratti in azoto, sia inoculati che non, avevano un punteggio più alto. L'estrazione in aria a bassi giri, restituiva un prodotto dopo 180 giorni di estrazione qualitativamente inferiore.

### Attività 2022

Considerati i risultati raggiunti, in particolar modo l'effetto significativo dell'inoculo e dell'impiego dell' $N_2$  durante la separazione a bassi giri, le attività nel 4° anno (campagna olearia novembre 2022) sono state impostate al fine di valutare la robustezza e replicabilità dei risultati ottenuti nelle attività precedenti sulla cv. Coratina. A tale scopo è stato approvvigionato mosto oleoso di Coratina presso il frantoio Cooperativa Sole Di Puglia (Cerignola, FG). È stato messo a punto un disegno sperimentale che ha previsto un incremento delle repliche di processo per i trattamenti di estrazione sotto flusso di  $N_2$  e in aria (controllo), con e senza inoculo. Nei campioni di olio sono stati misurati anche dei parametri indicatori dell'efficacia del trattamento di separazione, quali i livelli di acqua residua e di ossigeno disciolto. Il campione di mosto oleoso (MO) aveva un contenuto di acqua di circa lo 0,9%, e successivamente alla separazione, sia in aria che sotto flusso di  $N_2$ , nei campioni si attestava intorno allo 0,19%, un valore poco al di sotto rispetto alla soglia massima indicata dagli standard qualitativi di riferimento e simile a quello delle prove precedenti.

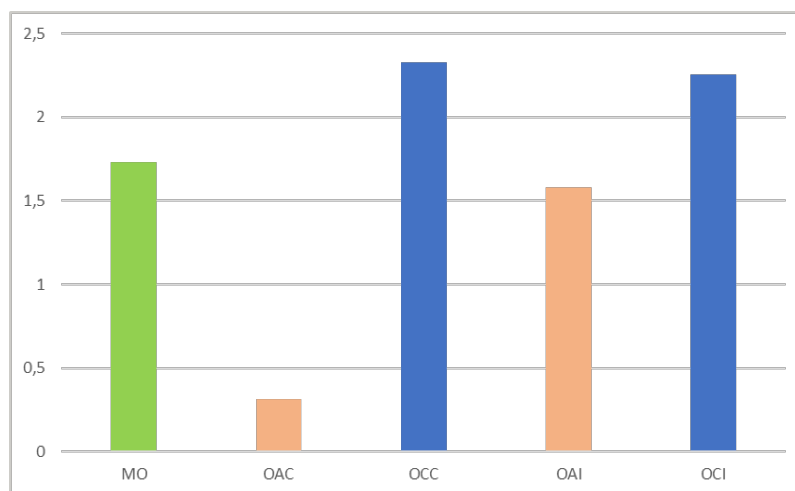


**Fig. 15. Contenuto d'acqua residua nei campioni di olio.**

L'analisi dell'ossigeno disciolto, rilevava un contenuto di ossigeno nel mosto oleoso di circa 1,7 mg/l e successivamente alla separazione diminuiva nei campioni estratti sotto flusso di  $N_2$  fino a 0,4 mg/l nel prodotto non inoculato (OAC) e 1,5 mg/l nel prodotto inoculato (OAI) (Fig. 16).

I campioni estratti con le condizioni di riferimento (in aria), sia con (OCI) che senza inoculo (OCC), avevano un valore di ossigeno residuo aumentato rispetto al mosto oleoso e compreso tra 2 e 2,5 mg/l. Questa analisi suggerisce come parte dell'ossigeno disciolto nel mosto oleoso era

contenuto nella fase acquosa, la quale è stata separata dall'olio tramite centrifugazione. Tuttavia la centrifugazione quando era effettuata in aria veniva massimizzata la dissoluzione dell'ossigeno nella fase oleosa, determinando valori più elevati negli olii rispetto ad un'estrazione sotto flusso di N<sub>2</sub>. Le analisi chimiche condotte dopo 24 h in laboratorio svelavano anche una significativa riduzione del numero di perossidi negli olii estratti sotto flusso di N<sub>2</sub> (8-8,5 mEq O<sub>2</sub>/kg), con e senza inoculo, rispetto ai campioni controllo estratti in aria (9-9,5 mEq O<sub>2</sub>/kg). I valori di acidità registrati nei campioni di olio dopo l'estrazione (24h) erano significativamente maggiore (valori compresi tra 0,4 e 0,45%) rispetto ai valori sulla stessa cv. ottenuti negli anni precedenti (circa 0,2%), probabilmente a causa delle condizioni pedoclimatiche più estreme che hanno determinato una maturazione anticipata e maggiore suscettibilità delle drupe ad attacchi di parassiti, tuttavia si è evinto un effetto significativo dell'interazione della variabile inoculo con l'atmosfera modificata, per cui i campioni con l'inoculo avevano valori di acidità più bassi, in particolar modo se estratti con N<sub>2</sub>.



**Fig. 16. Ossigeno disciolto (mg/l) nei campioni sperimentali. MO: Mosto oleoso; A: estrazione sotto azoto; C: Estrazione in aria; I: prodotto inoculato; C: prodotto non inoculato.**

### **Osservazioni conclusive sul prototipo di separatore in atmosfera modificata a bassi giri (SAM)**

La chiarificazione con SAM, sia sotto flusso di azoto che in assenza di ossigeno in ingresso, conserva le più importanti proprietà chimiche dell'olio migliorandone la qualità ed anche la stabilità dal 4 % fino al 20 % rispetto alla centrifuga in oleificio, con una variabilità determinata dalla cultivar e oleificio.

L'impiego dell'inoculo sperimentale migliora il livello della qualità ossidativa dell'olio, aprendo un nuovo scenario sulla possibilità e modalità di impiego nel processo (quando conviene inoculare?).

I risultati suggeriscono che il processo di chiarificazione dell'olio presenta margini di miglioramento per cui è opportuno investigare ulteriormente l'effetto delle miscele gassose e della loro interazione con la velocità di rotazione della centrifuga ed il contenuto d'acqua sulle caratteristiche del prodotto.

Alla luce dei risultati ottenuti è doveroso valutare l'intensità da applicare al processo di chiarificazione in funzione del contenuto di acqua del prodotto, puntando anche alla sostenibilità energetica.

## Bibliografia

- [1] Visioli F., Bellomo G., Montedoro G.F., Galli C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 117: 25-32.
- [2] Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Montedoro GF., Zappia V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.*; 10(3): 159-165.
- [3] Velasco J., Dobarganes C. (2002). "Oxidative stability of virgin olive oil" *Eur. J Lipid Sci. Technol.*, 104,661-676.
- [4] Visioli F., Bellosta S., Galli C. (1998). "Oleuropein, the bitter principle of olives, increases nitric oxide production from mouse macrophages". *Life Sci.*, 62, 451-456.
- [5] Montedoro GF., Baldioli M., Servili M. (1992). I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica. *Giornale Ital. Nutriz. Clinica e Preventiva*. 1(1): 19-32.
- [6] Morales M. T., Alonso M. V., Rios J. J., Aparicio R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*; 43(11): 2925-2931.
- [7] Angerosa F., Di Giacinto L., d'Alessandro N. (1997). Quantitation of some flavor components responsible for the 'green' attributes in virgin olive oils. *J. High. Resol. Chromatogr*. 20(9): 507-510.
- [8] Aparicio R., Morales M.T., Alonso M.V. (1996). Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(10): 1253-1264.
- [9] Di Giovacchino L. (2012). Separazione finale dell'olio vergine da stoccare e imbottigliare. *Ricerca olio*, pag. 28-32.
- [10] Masella P., Parenti A., Spugnoli P., Calamai L. (2009). Influence of Vertical Centrifugation on Extra Virgin Olive Oil Quality. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1137-1140.
- [11] Reg. CEE 2568 della commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti.
- [12] Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oils, COI/T.15/NC No 3/Rev. 13 June 2019

---

## Oil / water separation plants to improve the final quality of extra virgin olive oils: technical evaluation and experimental results

---

*Attilio Matera\*, Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Giuseppe Genovese, Luciano Scarano, Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

### Introduction

The growing attention by consumer towards the role that food plays in safeguarding health has made it possible to include extra virgin olive oil among the foods with a high functional and health significance. The uses of olive oil since ancient times have been the most varied, in fact even if the most important role it plays in the diet for cooking food and as a condiment, olive oil has also been a component of the oldest medicines. Several studies have shown, in fact, that some compounds, mainly phenolic substances, are related to a long series of positive effects on human health (1,2). The polyphenols present in olive oil are natural antioxidants that have beneficial effects for our health, but also for the stability of the oil itself since it increases its shelf life by defending it from oxidative damage (3,4). The production of polyphenols, which occurs in oil cells, is due to reactions catalysed by the cellular enzyme kit, which is determined on a genetic basis and induced by a set of environmental factors such as climate and territory. It follows that the qualitative-quantitative profile of an oil is closely linked to the production land characterized by certain types of cultivars, climatic conditions and an adequate production process. They intervene as direct antioxidants, lower cholesterol levels and inhibit LDL peroxidation, slow tumor growth, inhibit some chemical carcinogens, slow platelet aggregation and, finally, perform hypoallergenic and anti-inflammatory activity.

The sensory aspect of extra virgin olive oil is also fundamental, represented by the set of properties that make it "acceptable" or "desirable" by the consumer. Sensory quality therefore includes the evaluation of the color, aroma and taste of the food. Color is the first sensory evaluation performed by the consumer. The compounds responsible for the color of virgin olive oils are part of the minor constituents. These are fat-soluble pigments such as chlorophylls, responsible for the green color, and carotenoids that give the yellow color. The olfactory note derives from a series of partially volatile compounds at room temperature, which makes them perceptible at the olfactory membrane level. Some of these compounds, such as terpene alcohols and some esters are called "original" aromas as they pre-exist in the fruit. Others, however, such as aldehydes and alcohols are called "derivation" aromas as they are compounds that are formed during the pressing of olives as a result of endogenous enzymatic mechanisms catalyzed by lipoxygenase. These compounds are responsible for the "fruity" sensation that for an olive oil represents a high degree of sensory quality.

The taste of virgin olive oils is due to the sensation of "pungent" and "bitter" probably linked to some phenolic compounds. The "taste-smell" phase of the sensory examination is certainly the most complex as it simultaneously involves volatile and non-volatile compounds with sensory impact and can highlight any synergistic effects related to their combination.

The sensory attributes of virgin olive oil are due to the strong stimulation of human sensory receptors caused by both non-volatile and volatile substances (5,6,7,8).

These particular characteristics of extra virgin olive oils are easier to appreciate as the consumer can express on the basis of his sensory perceptions a quality judgment on the oil used. These are precisely the characteristics that in recent years have led to a growing demand for high quality extra virgin olive oil, therefore the choice of technologies and the appropriate design of the extraction processes represent an important tool to protect and enhance the organoleptic and nutritional characteristics of the oil during the transformation process. All the operations involved in the extraction process have, in fact, the purpose of extracting the oil from the fruit while preserving as much as possible the original organoleptic and nutritional characteristics. In this perspective, mechanical extraction allows to extract triglycerides in the most intact form possible, allowing to preserve as many minor compounds as possible that characterize olive oil from an organoleptic point of view and favors the formation of new aromatic chemical compounds that were not present in the drupe, but which originate from the action of enzymes released by the breakdown of plant tissues.

To obtain a quality oil, a fair degree of ripeness of the drupes is also necessary, suitable methods of collection and extraction, not neglecting appropriate hygienic-sanitary measures that can be pursued through adequate phytosanitary defense and rational harvesting, post-harvest and transformation operations that aim to minimize the manipulation of the product. Ultimately, the quality of olive oil can only be obtained through respect and preservation of the intrinsic properties of the original product enhanced through a rational extraction process.

These needs require greater organization between scientific research, the oil machine manufacturing industry and producers, in order to propose innovative technologies that enhance the quality of the oil, without penalizing extraction yields.

### **Extra virgin olive oil extraction process**

Virgin olive oil is an oil obtained solely by mechanical or other physical processes, under conditions that do not cause alteration of the oil, and which has not undergone any treatment other than washing, decantation, centrifugation and filtration. The goal of extraction methods is to extract as much oil as possible from the fruit without altering its original quality. For this reason, it is essential to use only mechanical or physical methods, avoiding chemical or enzymatic reactions that can alter its natural composition.

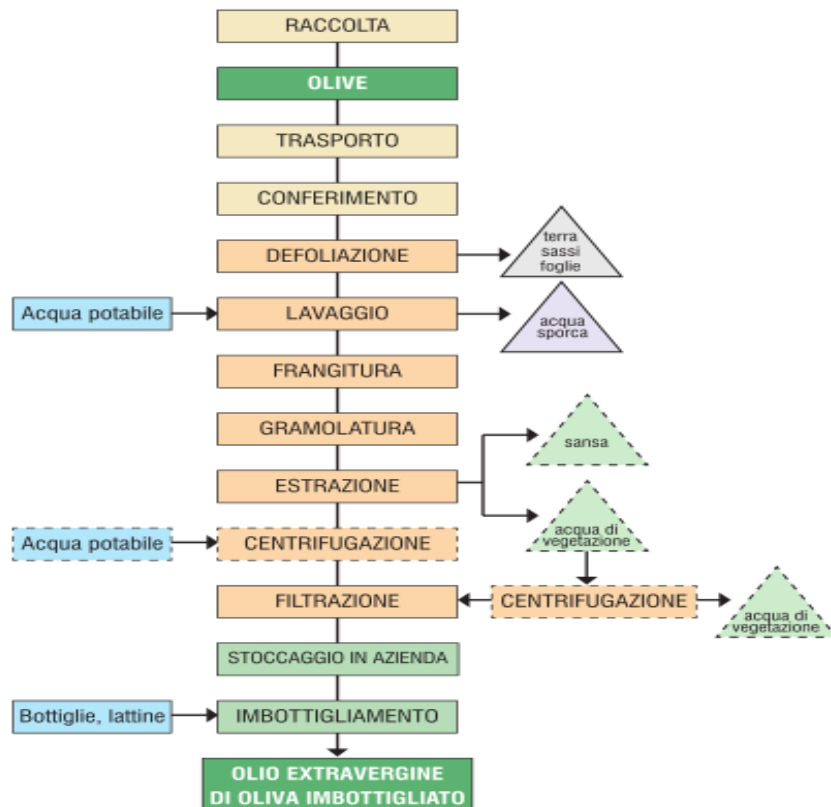
The quality of the oil, in fact, is mainly determined:

- from the state of ripeness of the olives at the time of processing;
- by extraction technology;

- from the delicate phase of conditioning-conservation of the oil.

The different technological operations can lead to a profound change in the composition of the oil following the transformation of some natural components of the olive (following enzymatic and oxidative interventions) and the distribution of aromatic and antioxidant components between the oily phase, the solid-colloidal matrix of olive paste and vegetation water.

The extraction process of virgin olive oil consists of a series of operations that lead to the release of the largest possible amount of oil contained in the cellular vacuoles of the drupe (Fig. 1).



**Fig. 1. Olive oil production process flow chart.**

The extraction becomes all the more difficult the more the quantity of oil is dispersed in very small droplets in the colloidal system of the olive paste or in emulsion with the vegetation water. The oil droplets, which are released following the rupture of the cells, come together in larger drops during the kneading phase through the physical phenomenon of coalescence, until they reach such dimensions that they can be separated into a continuous liquid phase: the oily must.

The oily must leaving the extraction plants has physical and chemical characteristics that depend on the technologies used upstream of the process, in particular the oil-pomace separation plants can affect both the sensory properties and oxidative stability, playing a fundamental role on the quantity and activity of phenolic compounds. The separation of the oily must from the olive pomace by pressure, although it returns a product with more polyphenols, has now been almost completely replaced by extraction by horizontal centrifugal separation (decanter) in two or three phases, which has allowed to give continuity to the process and reduce extraction times (Fig. 2).

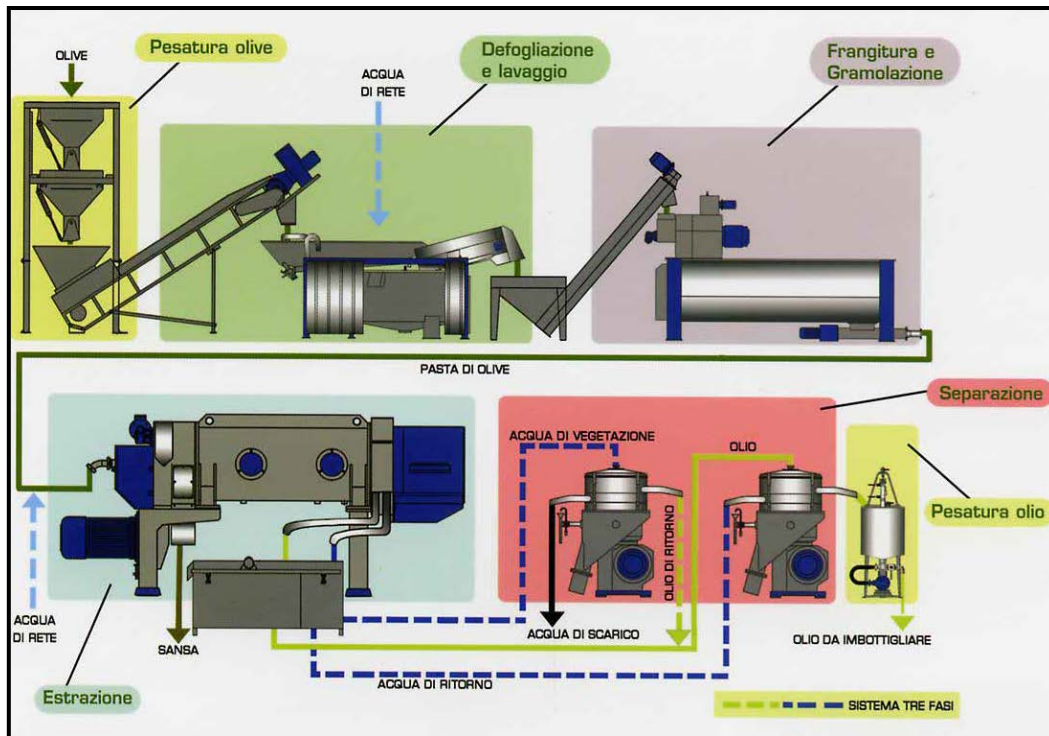


Fig. 2. Continuous method - extraction with three-phase decanter.

### Plants for the clarification of oily must

Whatever the extraction system that the oil mill adopts, the oily must that separates from the plant is always accompanied by more or less high quantities of vegetation water and small plant fragments. The water content of vegetation and solids varies in the oily wort varies from 2-5% in the three-phase decanter up to 5-15% in the two-phase decanter.

Water and solids are separated for different densities of liquids, using two different techniques:

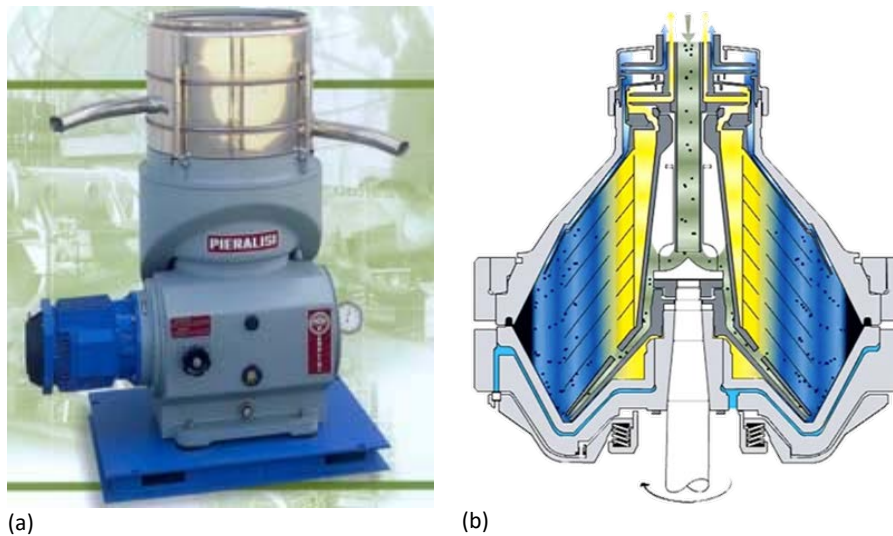
- decantation;
- centrifuging.

Decantation is a traditional method, based on the non-miscibility of the oil with vegetation water. During the resting phase, the oil, being lighter than water, tends to surface and separate.

After this first phase it is necessary to separate the residual water present in the oil; This operation requires longer oil stationing times in tanks of special masonry. This method has been completely abandoned, because it does not allow to obtain high quality oils. Today, the liquid phase from the various extraction layers is separated by means of vertical disc separators (Fig. 3).

Disc stack centrifuges have the vertical axis of rotation and are also known as cap centrifuges. Rotating at high speed (about 5000-6000 rpm), they allow, on the one hand, to obtain a clean virgin olive oil, even if still slightly turbid and, on the other, to recover that small part of oil dispersed in emulsion in the aqueous phase.

This type of centrifuges are formed by a series of truncated conical plates, placed at a distance of about 1 mm from each other and mounted on the hollow shaft of the drum.



**Fig. 3. Vertical disc stack centrifuge (a); centrifuge cross-section, (2)**

In this centrifuge the power supply takes place from above along a central and fixed tube that flows into a larger diameter, rotating, which brings to its lower end a conical disc, finned in the lower part (called distributor) to guide the flow outwards helping it to increase its speed up to the value expected by centrifugation. Above this disk are superimposed others (about a hundred). They are characterized by radial protrusions on the back and have a thickness not exceeding 2 mm. In this way, gaps are formed between the discs of the same thickness, within which the turbid liquid rises towards the center of the centrifuge. The fractions of heavy liquid due to the centrifugal force come out of the lower and outer part of the discs, lapping the lower face of the immediately upper disk. Heavy particles collect in the peripherally located sludge chamber. This chamber, of bitonic shape, is the result of two drums or boluses, one upper and one lower, both conical that constitute the closing surface of the rotating complex. The fractions of light liquid, subject to less centrifugal force, not being able to discharge towards the outside of the discs, because prevented by the presence of the heavy liquid, due to the centrifugal pressure rise towards the center of the discs flowing on them. The two liquids therefore flow in opposite directions and it is thus possible to separate them.

The discs act as a sedimentation surface and thanks to their inclination they clean themselves allowing the scum to slide into the sludge chamber.

During the operation of the centrifuge, the sludge accumulates more and more and it must be eliminated from the chamber. This operation is performed through holes that are closed during the work phase and open during the discharge of solids. The opening and closing system of the holes essentially costs a double movable bottom that is in a high position during closing and moves to a low position during opening. The movement of the double bottom is due to a hydraulic system that exerts upward pressure during closing and downward pressure when opening. A game of manually

or automatically controlled valves introduces the service liquid into the appropriate spaces and discharges it from these to implement the system.

The discharge of solids can be partial or total. In the first case, the double movable bottom closes when the solids have not yet been completely discharged. When it is total, however, the double bottom remains open long enough to let out all the solids and even a part of the liquids. With the partial discharge of solids there is no loss of liquids, but the closure risks causing wear of the hole closing system. In the total discharge of solids, on the other hand, there is the loss of liquids. The best solution is to interlayer a series of partial openings with a total opening.

The opening and closing command of the holes can be implemented by:

- a timed system: which regulates the intervals between one opening and another;
- a turbidity-friendly system: a photocell on the clarified liquid pipe detects the presence of torpidity when the sludge chamber is full and controls the opening of the holes;
- a hydraulic system sensitive to pressure variations: in practice, a small fraction of clarified liquid is sent back to the sludge chamber through a small pipeline. A precision pressure gauge measures the pressure required for this flow. When the sludge chamber is full, the small pipe becomes occluded and the fluid supply pressure increases. This increase in pressure controls the opening of the holes and the discharge of the solids.

There are decanter centrifuges with continuous sediment discharge, in which the holes are always open. They are used to concentrate suspensions of precious materials (starch, yeasts) eliminating most of the liquid.

As for the discharge of the clarified liquid, in almost all centrifuges, it takes place by means of a device that transmits considerable energy to the fluid and makes the centrifuge work like a real pump. This allows the clarified liquid to be sent to a storage tank or other process machine. It is a simple disc integral with the power channel of the suspension and internally cable with particular spiral finning. In this disk the kinetic energy possessed by the fluid due to the rotational motion is transformed into potential energy.

A drawback of disc centrifuges is due to the fact that when used on food liquids they determine, due to the violent mechanical action developed by the organs on the liquid, deterioration of the mechanical characteristics of the fluid, heating and intimate mixing of ambient air, resulting in high diffusion of oxygen in the food liquid. This is in contrast with the current increasing attention of consumers to the product quality of food products, with a concept of genuineness that links the product consumed to the original product, which has led to a push and re-examine the production processes and machines used in the food industry with a perspective that takes into account productivity, but which mainly aims at maintaining all the chemical-physical characteristics of the food product original, without causing any change in the composition of the processed food.

In addition to the disc centrifuges discussed above, so-called "super centrifuges" are also known. These are centrifuges with baskets of 10 cm in diameter, 1-2 m long and equipped with small

longitudinal diaphragms so that the liquid can reach the same speed as the basket more quickly. This rotates at about 60000 rpm, but when you have to overcome colloidal solutions or break emulsions the speed can reach 100000 rpm. In the latter case, the engine organ is mostly similar to a small air turbine. In order for the component of greater specific gravity to have time to move to the walls, the mixture is brought from below and the two separate components are brought out from above after a rather long journey. From the site farthest from the tree there is the exit of the thickest liquid. Super centrifuges are used in the mineral and vegetable oil, wine and liqueur industries; They have the advantage of significantly reducing the separation time, compared to a normal centrifuge.

Like disc centrifuges, super centrifuges also have the aforementioned drawback related to the discharge of solids and the inconvenience of causing a deterioration of the mechanical characteristics of the fluid, heating and intimate mixing of ambient air, resulting in high diffusion of oxygen in the food liquid.

The research developed in the last thirty years, through the study of fluid dynamics of horizontal centrifuges (decanters) has had as its fundamental objective the improvement of yields through the construction of increasingly efficient and reliable machines. All this is not enough, as it is necessary to revisit the whole process, in its individual operational phases and as a whole, in order to maximize the nutritional and sensory quality, and at the same time increase the content in minor components. For several years the question has been raised about the influence of the forced passage of the oily must in the vertical centrifuge and about the effect that the high rotation speed can determine on the quality of the oil and on the quantity of oxygen that melts in it, as a result of the high pressure generated by the centrifugal force (9).

In a work carried out by Masella et al. (10) the influence of vertical centrifuges on the quality of extra-virgin olive oil was evaluated. Oil samples were analyzed before and after centrifuge treatment; The results obtained show that the treatment determines important variations in some qualitative aspects of olive oil. Immediately after centrifuge treatment, an increase in dissolved oxygen concentration was detected, and there was also a significant increase in peroxide content and spectrophotometric index K232, respectively of 40 and 14%. Significant differences occurred only for simple phenols, while for secoiridoids, the most important class of polyphenols, there were no significant differences between before and after treatment. Significant differences were also found for the content of volatile components that are significantly higher for the samples analyzed before treatment with the vertical centrifuge. These oils have, in fact, more marked fruity notes. This work suggests the need for adequate design of liquid-liquid separators so as to reduce dissolved oxygen content in order to contain degradation of functional components for oil stability and consumer health.

### **Olive Oil Quality Parameters**

Based on the quality level, identified by chemical parameters (acidity; number of peroxides; spectrophotometric constants and ethyl esters of fatty acids) and organoleptic (organoleptic evaluation) as defined in Annex I of EU Reg. 2016/2095, olive oils are classified into:

- Extra virgin olive oil
- Virgin olive oil
- “Lampante” olive oil

**Tab. 1. Classification of olive oils according to chemical parameters**

Categoria	Acidità (%)	N° di Perossidi (mg O <sub>2</sub> /kg)	Esteri etilici di acidi grassi (mg/kg)	Spectrofotometria			Valutazione organolettica	
				K232	K270	Δ K	mediana Fruttato	mediana Difetto
<b>Olio Extra Vergine di Oliva</b>	≤ 0.8	≤ 20	≤ 35	≤ 2.5	≤ 0.22	≤ 0.01	> 0	= 0
<b>Olio di Oliva Vergine</b>	≤ 2.0	≤ 20	-	≤ 2,6	≤ 0.25	≤ 0.01	> 0	≤ 3,5
<b>Olio di Oliva Lampante</b>	>2.0	-	-	-	-	-	-	> 3.5*

### *Free acidity of the oil*

Acidity measures, as a result of lipolysis, the formation of free fatty acids. Lipolysis is a hydrolysis reaction that affects the structure of triglycerides and consists in the breaking of a bond between glycerol and one or more fatty acids esterified to it. It occurs by an enzyme present in the pulp of olives, lipase in the presence of water. The measure of acidity is certainly the first index of the quality of the product as it is directly determined by the quality of the olives in terms of integrity of the fruit at the time of processing. Factors affecting the free acidity of the oil:

- degree of ripeness of the olives;
- phytosanitary status of olives;
- storage times of olives

Even prolonged contact between oil and vegetation water and/or sludge can lead to an increase in the free acidity of the oil.

### *Peroxides Number*

This parameter measures the primary oxidation of the oil, therefore the formation of hydroperoxides due to the reaction between unsaturated fatty acids and oxygen in the presence of catalysts (heat, metals; light). The value takes on different meanings depending on the moments of an oil's life:

- In a fresh oil it measures the level of oxidation due to the harvesting and storage operations of the olives, providing an indication of the quality of the raw material used;
- In stored oil it measures the accumulation of peroxides as a result of oxidation phenomena favored by the presence of air and catalyzed by: heat, light and metals.

However, the peroxides number tends to increase during the storage phase of the oil due to the slow but progressive action of the factors that favor radical oxidation.

### ***Spectrophotometric constants***

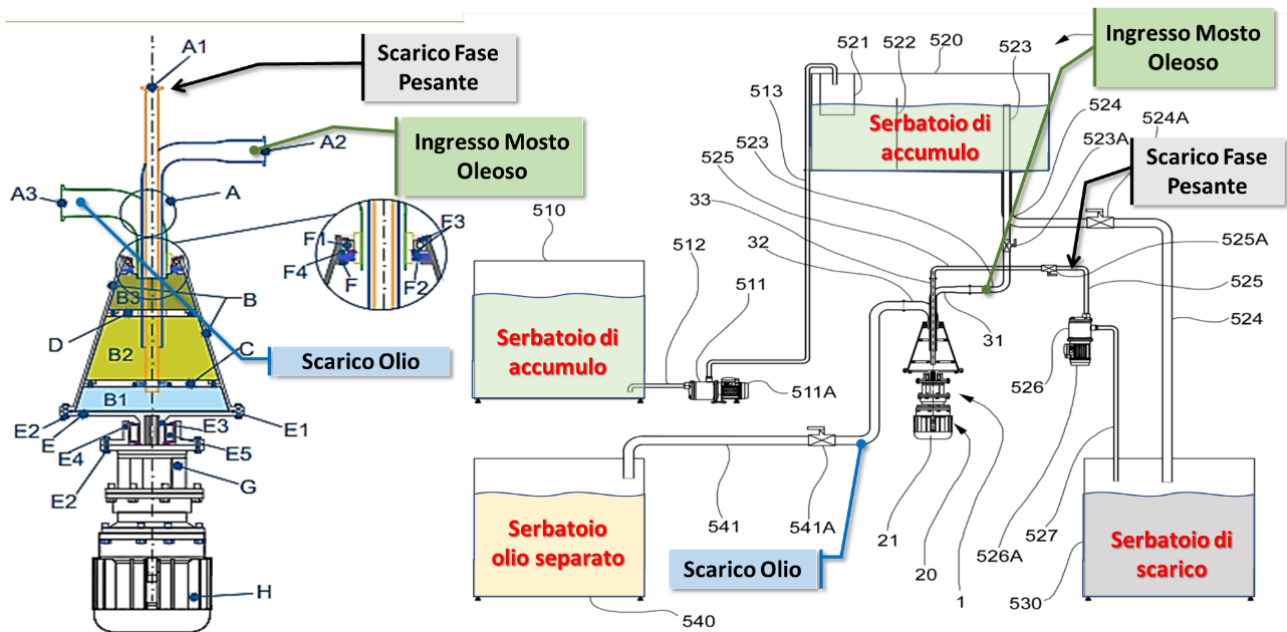
The peroxides number is not sufficient to define the oxidation state of the oil as during storage this parameter may undergo a decrease as a result of the decomposition of the hydroperoxides themselves (secondary oxidation) with the formation of aldehydes and ketones and volatile acids responsible for the rancid defect. Absorptions at wavelengths 232 nm and 270 nm indicate the oxidative state of the oil, since conjugated dienic and triene systems can be formed following oxidation of the oil. Primary oxidation, which results in the formation of hydroperoxides, increases absorption to 232 nm. Secondary oxidation, with the formation of secondary carbonyl compounds, results in an increase to 270 nm.

### **Experimental activities**

The experimental activities were conducted along four olive oil seasons (2019-2022) and had as their objective the improvement of oil quality through plant engineering approaches. The research had as macro objectives: (i) the construction and patent of an oil/water/sludge centrifugal separator operating at low rpm (Rotased) to improve the final quality of the oil and (ii) the development of a new separation system in a controlled atmosphere, in order to safeguard EVOO from oxidation and to create the optimal conditions to maximize the oxidative stability of the nutraceutical components and maximize the overall final quality of the oil, with respect to product parameters (11, 12). The activities were carried out in synergy with the business partners of the project with approaches depending on the type of activity, as described below. For the development of the Rotased, the tests were conducted at the Ruscigno oil mill (Tricarico, MT), where the machine was installed downstream of the extraction line and operated under different conditions, with the aim of defining the maximum conditions to optimize the quality of the final product. The subsequent activities involved the extraction of the oily must in the oil mill (Ruscigno; Picciariello (Bitonto, BA)), transport to the laboratories of the University and inoculation with an additional culture (bacteria and / or yeasts) selected by the Industrial Microbiology group of the University of Basilicata. The inoculated oily must (and the non-inoculated control), following incubation for 16h, was then treated with a centrifugal disc separator, operating in a controlled atmosphere, to eliminate water and residual solids.

### ***Design, construction and patent of an oil/water/sludge separator to improve the final quality of EVOO.***

The centrifugal separator "ROTASED" developed by the group of Machines and Plants for the Food Industries is in fact a rotary sedimenter. The purpose of the machine is to provide a rotary sedimentation for the solid/liquid and liquid/liquid separation of food liquids that is able to overcome or reduce at least in part the drawbacks discussed above. The invention will be better understood by the following detailed description of its forms of execution.



**Fig. 4. Detailed section of ROTASED (left) and complete separation plant (right).**

Initially referring to Fig. 4, this figure shows a diagram of the plant for the solid/liquid and liquid/liquid separation of food liquids according to a first form of realization currently preferred. The separation plant includes a rotary sedimentation plant according to a first preferred form of realization. The separator is in particular a rotary sedimentation plant with vertical axis for solid/liquid and liquid/liquid separation of food liquids. In other words, the rotary sedimentator is suitable for clarifying both a turbid (i.e. a liquid to be clarified) consisting of or comprising, for example, two insoluble liquids of different densities, and a turbid one consisting of or including, for example, a liquid and solids. As is known, the term "turbid" means a material in a liquid state that includes or is composed either of at least two liquids insoluble between them or of at least one liquid and solids that are insoluble with each other. The separation system includes a tank (510) for turbidity, a pump (511) for feeding the turbid, a sampling pipe (512) of the turbid operationally interposed between pump 511 and tank 510. The separation system 500 includes a supply pipe (513) of the turbid operationally interposed between pump 511 and a tank (520), or storage tank, which has the function of feed accumulation tank for the rotary sedimentation tank. The 520 storage tank includes a 521 basket grid and a separation septum (522) placed inside the storage tank (520). A pipe (523-31), for the intake of the turbidity, is operationally interposed between the storage tank 520 and the rotary sedimentator. The turbid fed into the sedimentation plant includes or consists of a first fraction of turbid at lower density (which corresponds to a clarified liquid intended to be discharged from the sedimentator) and a second fraction of turbid at greater density than the density of the first fraction of turbid.

A discharge pipe 541-32 to discharge a clarified liquid from the sedimentator is operationally interposed between the rotary sedimentator and a discharge tank (540) provided to receive the clarified liquid. It should be noted that this clarified liquid corresponds to the aforementioned first fraction of turbid at lower density than the turbid introduced into the sedimentation plant.

A sampling pipe 525-33 to withdraw the aforementioned second fraction of turbid from the rotary sedimenter is operationally interposed between the rotary sedimenter and a sampling pump (526). In particular, the second fraction of turbid corresponds in practice to the fraction of turbid at greater density that is separated in the sedimentator 1.

The pumps 511 and 526 and the rotary settling plant are each equipped with their own drive unit (511A, 526A, 20). The drive units 511A, 526A of pumps 511 and 526 comprise respective electric motors 511A and 526A. Drive unit 20 of rotary sedimentator 1 comprises an electric motor (21). According to a preferred form of realization, the electric motors are operationally connected to an electrical panel and are individually controlled by an inverter for the regulation of the rotation speed of these motors.

To avoid the mistreatment caused by the high rotation speed of the disc centrifuge and, to offer operators the possibility to control the desired level of clarification, the Rotased acts by operating a gravity sedimentation, which is improved by applying an appropriate centrifugal acceleration field to the mixture to be separated.

The physical principle on which it is based is sedimentation in laminar regime.

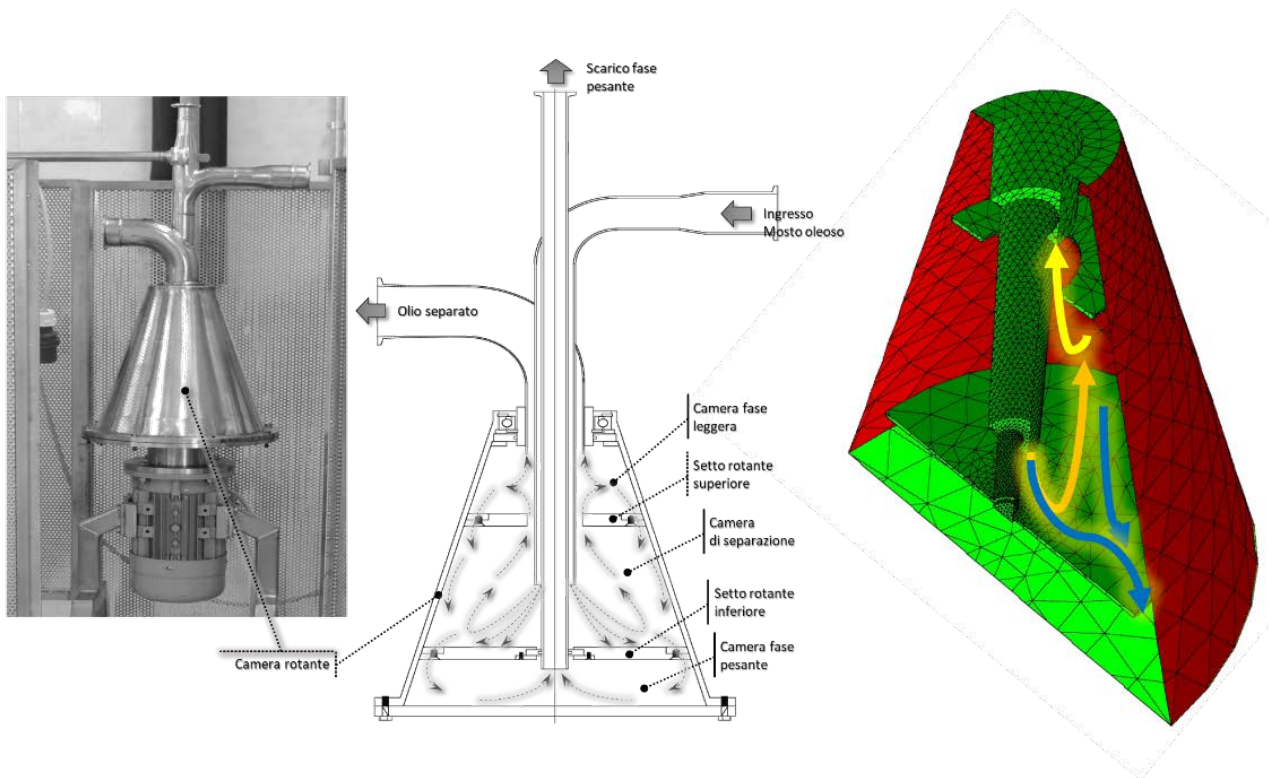
Operating at a significantly lower number or factor "g" (6 x g) than the centrifuges normally used (5000 x g), the innovation arises as an intermediate solution between natural sedimentation, generally considered too slow and not very effective, and sedimentation performed with disc centrifuges extremely effective but less "respectful" of nutritional and organoleptic characteristics. This separation allows to produce a percentage of quality oil, ranging from 50% to 90% of the treated oily must, without causing oxygenation, heating and homogenization of the product.

A regulation valve allows the adjustment of the input and therefore of the residence time of the product inside the machine.

The innovation, compared to pure sedimentation by gravity, consists in improving or helping sedimentation obtained by imposing an appropriate rotation speed which, always in a laminar fluid dynamic field, adding to the acceleration of gravity (this has been designed to occur at about 100 RPM), generates acceleration vectors that are parallel to the lateral surface of the truncated cone only in its upper part (Fig. 5), in order to create an internal motion that drags the predominant light phase towards the upper exhaust, and at the same time, the heavier phases towards the lower exhaust, with further separation of the light phase that is pushed towards the axis of rotation and then forced to go up towards the upper discharge of the light phase.

Also innovative is the feeding system for the autonomous management of the retention time of the product in the machine, in fact the feeding and unloading flow rates of the light phase is implemented through a repechage pump of the sedimented heavy phase.

The appropriate adjustment of the latter allows to adjust the flow rate of separated light liquid that takes place by touching from the upper part of the truncated cone, while the introduction of the product takes place by gravity from a tank placed above the machine itself.



**Fig. 5. Photo of the ROTASED and detail of the acceleration vectors generated during operation and 3D reconstruction of the internal chamber of the sedimentator.**

Previously, a fluid-dynamic simulation of the prototype operation was conducted using OpenFoam, an open-source software (Fig. 6).

A fluid-dynamic simulation of the operation of the prototype itself was conducted using OpenFoam, an open-source software for fluid dynamics and multiphysics simulation. We simulated a two-phase incompressible 2D flow, with rotation and gravity. A k-epsilon SST turbulence model was used, which lends itself well to describing fluctuating regimes from laminar to turbulent, even if the test cases of interest are laminar. In particular, laminar operation is preferred to avoid mixing between the phases, and to have an optimal separation of the same. The two-phase flow is resolved through a VOF (Volume Of Fluid) model. It characterizes the two-phase flow through the Navier-Stokes equations written for the mixture, and solving a new equation for the volume fraction ( $\alpha$ ) that describes the degree of presence of the two phases in a given volume.

The simulation shows:

- the correct separation of the two phases oil (blue) + water (red);
- that the light phase (oil) is accumulated and discharged from the top of the machine, while the heavy phase (water) is transferred to the bottom;
- that the separation is facilitated by a speed of approximately 100 rpm, which induces a limited centrifugal force on the product, accelerating its separation;
- that the motion remains laminar and there are no mixing with the oxygen contained in the air, in this way the quality of the initial product is preserved intact.

The fluid-dynamic simulation has shown and clarified how an increase in flow generates different flow regimes within the centrifuge, but does not succeed by itself in making the two outlets selective for the two different phases.

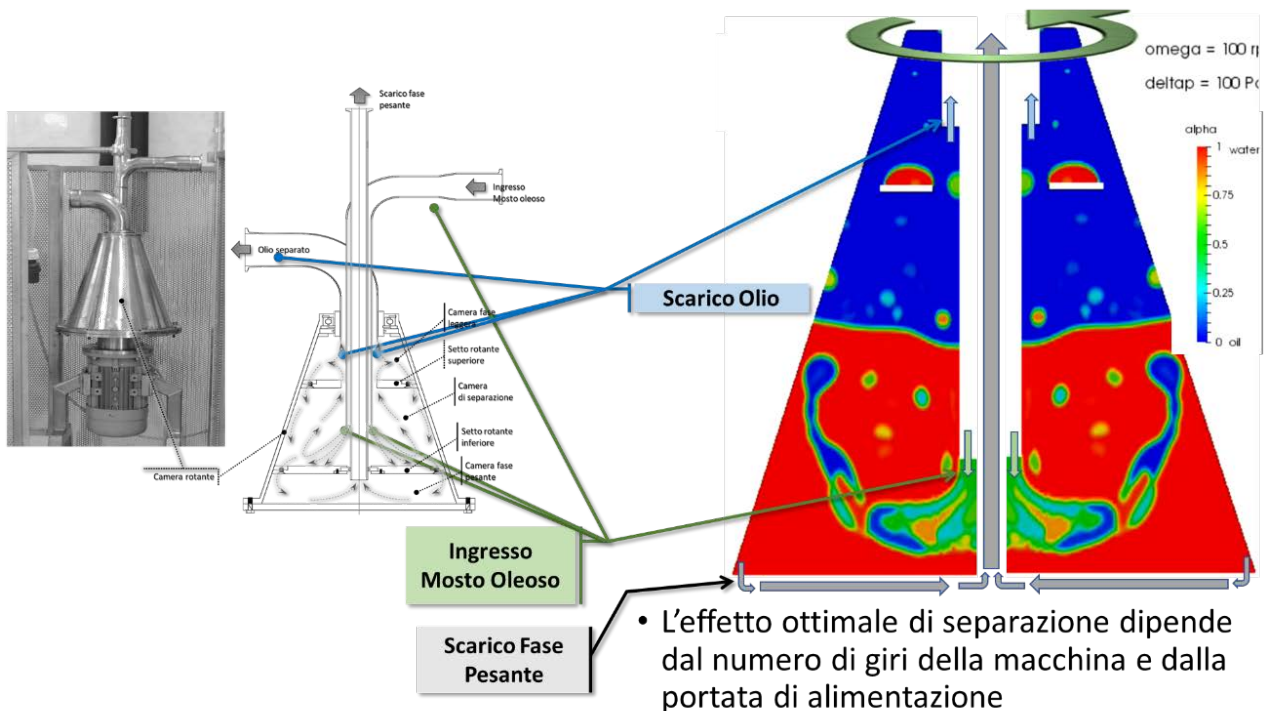


Fig. 6. Fluid dynamics simulation conducted with OpenFoam

### Experimental tests conducted with ROTASED

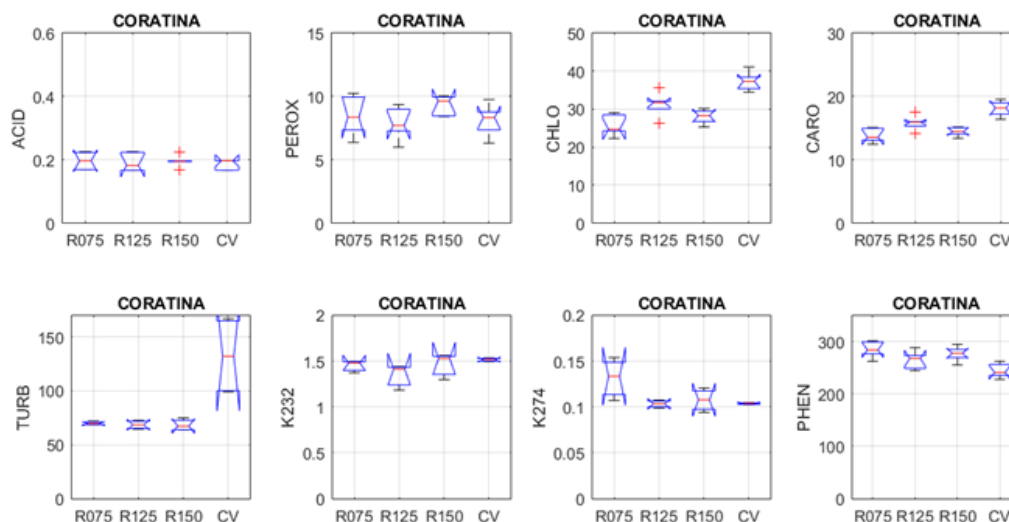
During the first year of activity (2019), experimental tests were carried out to compare Rotased treatments with CV. Coratina at the oil mill Ruscigno in Tricarico (MT) (Fig. 7).

The use of the experimental prototype (Rotased) for liquid-liquid separation was evaluated with the aim of defining the design criteria for the construction of a prototype plant for the separation of olive oil from the oily must leaving the decanter, in order to eliminate most of the residual water without resorting to the centrifugal separator. During the tests, 3 operating conditions were tested, namely rotational speed (75, 125, 150 rpm). The experimental oils obtained were analyzed with respect to the main commercial parameters (acidity, peroxide number, spectrophotometric indices K232 and K270) using official methods (11) and with respect to quality criteria (polyphenols, carotenoids, chlorophyll, turbidity).

The degree of ripeness of the Coratina olives used during the test was about 60% green and 40% black (Fig. 7), considered an optimal level of ripeness for in relation to the quality of the oil and the extraction rate. In Fig. 8 the results obtained from the analysis of the CV samples are graphically represented. Coratina.



Fig. 7. Above, photos of the employees in the experimentation. Below photo of the separation system installed in the oil mill.



**Fig. 8. CV Coratina analysis results.**

From the results obtained the first most important data is that all oils had the minimum chemical requirements to be categorized as extra virgin, however characteristic trends were observed for each parameter investigated. The acidity value in the experimental samples and in the control (CV) was very low (about 0.2%), and not statistically different between samples. The number of peroxides was lower in the samples extracted using Rotased 125 rpm (7.71 mEq O<sub>2</sub>/kg), while the value of carotenoids and chlorophylls was lower in the experimental samples. From the data as such, it is not clear what the best treatment may be. It is necessary to consider the relative percentage variations with respect to a reference, the chosen reference is the action carried out by the vertical centrifuge CV. In addition, to decide on the best treatment, you need to choose a goal, the chosen goal is the overall oxidation state of the product. This objective is measured by the 4 parameters ACID, PEROX, K270 and K232. Therefore, the mean of the 4 parameters (sign change) was used to evaluate the oxidation state. A positive score indicates a low oxidation state while a negative score indicates a high oxidation state (Table 2).

**Table 2. Relative percentage changes in chemical parameters with respect to the vertical centrifuge.**

Coratina	R075	R125	R150	CV
ACID < 0.8	0.0%	-10.0%	0.0%	0.0%
PEROX < 20	0.2%	-7.6%	15.5%	0.0%
CHLO	-33.8%	-14.9%	-24.2%	0.0%
CARO	-25.4%	-12.3%	-20.5%	0.0%
TURB	-47.3%	-48.1%	-49.0%	0.0%
K232 < 2.5	-2.6%	-7.2%	0.7%	0.0%
K270 < 0.22	30.0%	0.0%	10.0%	0.0%
PHEN	17.8%	11.1%	15.2%	0.0%
<b>PUNTEGGIO</b>	↓ -6.9	↑ 6.2	↓ -6.5	

With these premises it is clear that R125 (Rotased at 125 rpm) has a score of +6.2 and represents the best treatment. In this case, a 10% decrease in acidity, an 8% decrease in peroxides,

a 7% decrease in K232 and an 11% increase in total polyphenols are observed. The experimental oils had a richer phenolic profile than the experimental samples, with a relative % increase compared to CV between 11.1% (125 rpm) and 17.8% (75 rpm).



**Fig. 9. CV Coratina – Comparison between the two oil extractions. Oil obtained with vertical centrifuge; (b) Oil obtained from Rotased.**

The experimental data obtained with the innovative Rotated separator, used for the final cleaning of the oily must before its subsequent bottling, highlight the effectiveness of the same in cleaning the oil and the possibility of replacing the traditional vertical axis centrifugal separators that are normally used in the final oil cleaning phase. However, unlike the latter, Rotased avoids excessive oxygenation and generates less oil heating, originating from the machines during separation. In addition, Rotased preserves the most important sensory and nutritional properties of an extra-virgin olive oil. Overall, the evidence collected represents a starting point for the preparation of the plant to be used industrially for the production of a "turbid" extra virgin olive oil.

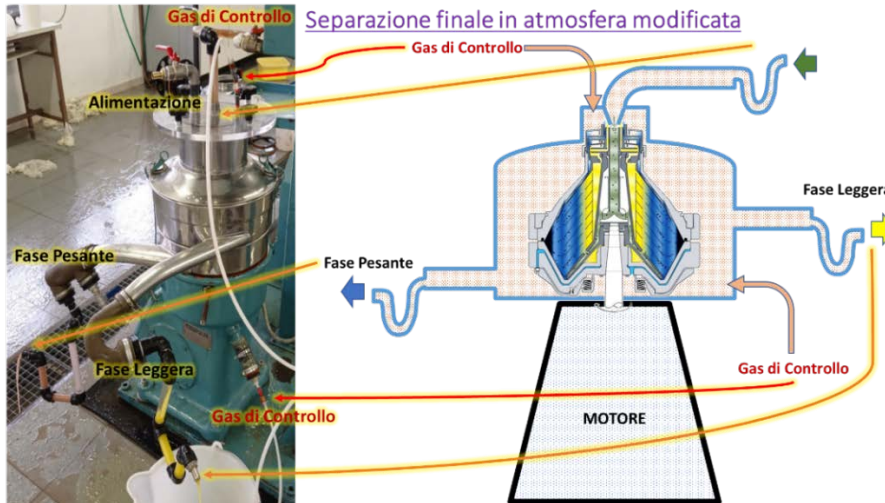
Also following the results obtained in these tests, Rotased received the patent certificate for industrial invention from the Ministry of Economic Development – Italian Patent Office on 28/01/2019 with the number 102016000078140.

Rotased can replace traditional separators in oil cleaning allowing considerable savings in terms of electricity (1.1 kW), avoids excessive oxygenation and generates less oil heating, preserves the most important sensory and nutritional properties of an extra-virgin olive oil.

### **Separation with prototype in modified atmosphere at low rpm (SAM)**

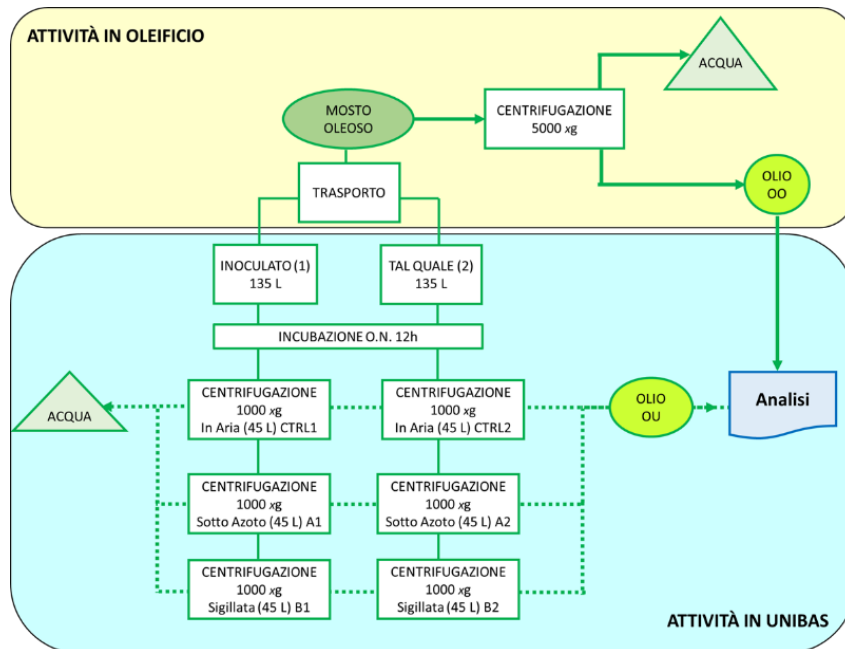
#### ***Activities 2020***

Activities in this phase investigated the effect of the variation of the rotational speed (1000 rpm) and the atmosphere in the headspace of the vertical disc centrifuge. The experimental low-speed disc centrifuge that has been used is an integrated part of a mini-discontinuous extraction plant supplied at the laboratories of the School of Agricultural, Food and Environmental Sciences (SAFE) of the University of Basilicata.



**Fig. 10. Photo and diagram of the centrifuge in operation.**

Therefore, in general, the experimental approach included the following series of common phases (Fig. 11): (i) supply of oily must from partner oil mills; (ii) transport to SAFE laboratories; (iii) overnight inoculation (12h) of the oily must using the microorganisms selected by the Industrial Microbiology group; (iv) oil separation with vertical centrifuge with discs at low rpm (1000 rpm) in modified atmosphere. The centrifuge has been suitably modified to allow, during extraction, the conditioning with 100% nitrogen (N<sub>2</sub>) or in the absence of incoming air (i.e. partial pressure of oxygen <20k Pa).



**Fig. 11. Schematization of the experimental activity.**

In this activity the tests were conducted on CVs. Coratina and Leccino, along several seasons. The oil extracted in air (Ctrl) was used as a reference to evaluate the effectiveness of the extraction in a modified atmosphere, while the oil extracted with the use of the conventional disc centrifuge in the oil mill (RIF) was used as a control to verify the effect of the speed of rotation in air. The

quality of the oil obtained was evaluated in the first instance by determining the marketability parameters with respect to an extra virgin olive oil, such as acidity (%), peroxide number (mEq O<sub>2</sub> / kg of oil) and spectrophotometric indices (K232 and K270), after 24 h and 180 and 360 days from extraction, using official analytical methods (11). Secondly, to compare treatments, a quality score was assigned to each sample obtained from each treatment. The analytical values have been transformed into percentage values compared to the maximum legal value for an extra virgin olive oil (Acidity<0.8%, Peroxides<20 mEq O<sub>2</sub>/kg; K232<2.5; K270<0.22). The quality level of the oils, therefore, was calculated as an average of the percentage values of these parameters.

Therefore, following this methodological approach, in the second year of activity (2020) it was possible to assign a score to the samples of oil extracted from the oily must of Coratina and Leccino cultivars, supplied at the Ruscigno mill (Fig. 12). The data suggest that at time 0, for both cultivars, chemically obtained oils can be categorized as extra virgin (0.17%<Acidity<0.24%; 5.69 mEq O<sub>2</sub>/kg<Peroxides<9.05 mEq O<sub>2</sub>/kg; 0.86<K232<1.10; 0.06<K270<0.12). In particular, as expected, there is a macro-separation of the samples that takes place according to characteristics depending on the shelf life, so that the newly extracted samples (24h) had a higher score, followed by those extracted at 180 and 360 days. The analysis of the data denotes (Table 3), moreover, as contextually to the extraction time, the products with the inoculum had the highest score, both in Coratina (from 62 to 64%) and in Leccino (from 61 to 68%).

**Tab. 3. Scores assigned to the oils of the cv. Leccino and Coratina on the basis of the quality level determined in the tests. 1: samples with inoculum; 2 samples without inoculation; A: extraction under nitrogen stream; B: extraction with the sealed centrifuge; Ctrl: extraction conducted in the air.**

TESI	TRATTAMENTO	TEMPO	LQ(%)
1	A	0	68,87
1	Ctrl	0	65,44
1	B	0	61,61
2	Ctrl	0	61,32
2	B	0	60,88
2	A	0	59,63
1	B	180	59,43
1	A	180	58,63
2	Ctrl	180	56,62
2	B	180	55,93
2	A	180	53,31
1	Ctrl	180	48,60
2	RIF	0	46,59
1	B	360	44,94
2	A	360	43,29
1	A	360	42,04
2	Ctrl	360	41,91
2	B	360	39,40
2	RIF	180	36,23
1	Ctrl	360	36,02
2	RIF	360	16,37

**LECCINO**

TESI	TRATTAMENTO	TEMPO	LQ (%)
1	B	0	64,20
1	Ctrl	0	62,97
1	A	0	62,45
2	A	0	61,19
2	Ctrl	0	60,37
2	RIF	0	60,23
2	B	0	58,69
1	A	180	58,52
2	Ctrl	180	57,04
2	A	180	52,98
1	Ctrl	180	52,98
2	B	180	52,58
1	B	180	50,81
1	Ctrl	360	39,24
1	A	360	38,37
2	B	360	36,37
2	RIF	180	32,24
1	B	360	31,97
2	Ctrl	360	28,64
2	A	360	18,99
2	RIF	360	17,00

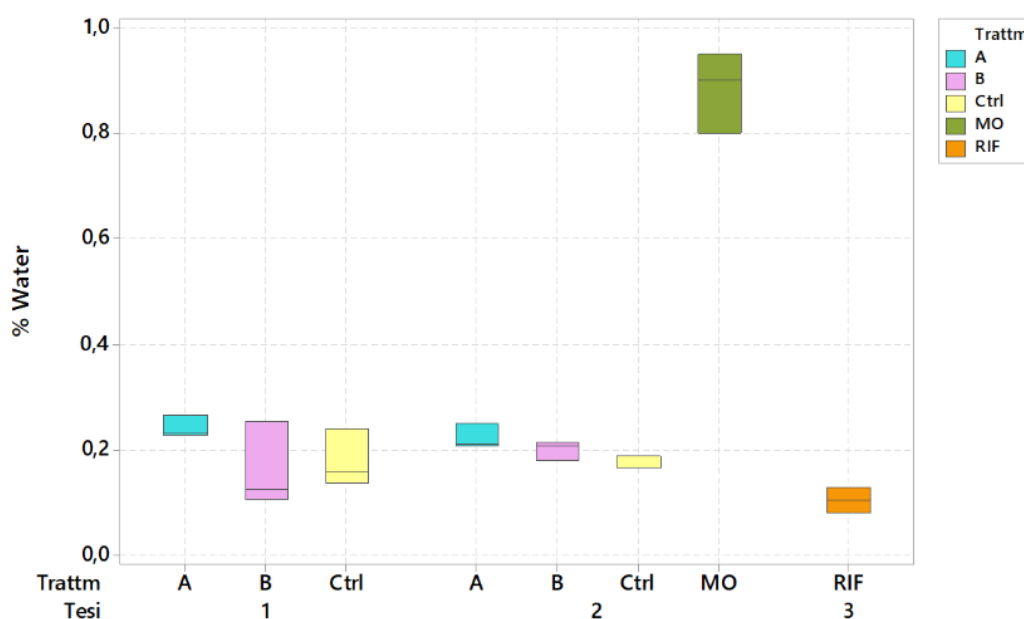
**CORATINA**

The score of the reference oils extracted in the oil mill (RIF) is relevant for both CVs. is below the experimental oils, in particular the Leccino (RIF) 24h after extraction has a lower score (46.59%) compared to experimental oils stored for 180 days; otherwise, Coratina (RIF) had a much better

quality level (60%) and similar to experimental oils not inoculated. The two CVs. They expressed a qualitative level also dependent on the extraction system used, suggesting that there is an effect of the interaction of inoculum variables and extraction conditions.

### Activities 2021

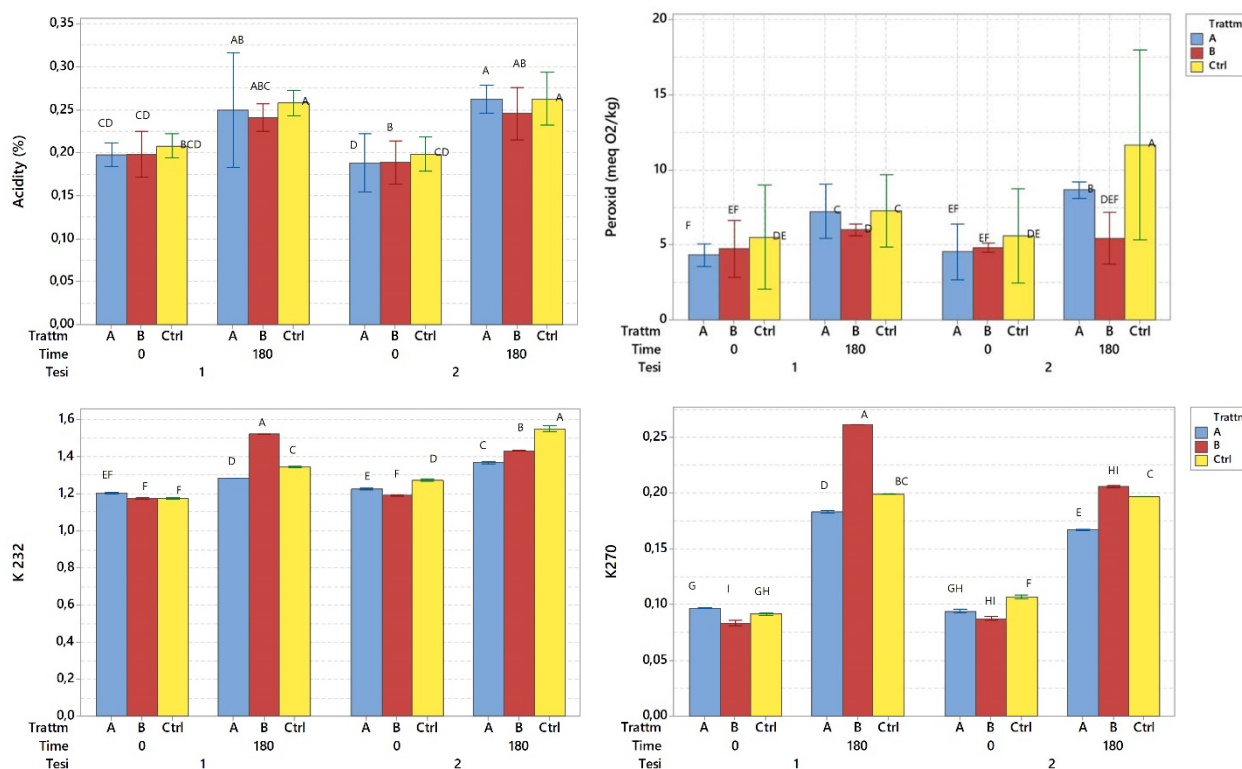
With the aim of confirming the results achieved in 2020, in the third year of activity (2021) the investigative approach used (i; ii, iii, iv) was replicated by proceeding with the separation of an oily must of CV. Coratina, supplied at the Picciariello oil mill near Bitonto (BA). In addition, the residual water content in the extracted oils was also measured by drying in an oven at 105 °C and measuring the weight until stability was achieved, to verify its correspondence with the reference quality standards (<0.2%). The residual water in the oily must was very low (0.9%), suggesting that the separation operation operated by the three-phase decanter in the oil mill was very effective, returning a poorly hydrated must. Despite this, the separation carried out both in the oil mill and in the experimental tests removed the water residues, returning a product with a maximum residue of 0.2%, using the experimental centrifuge, up to 0.1% when the separation was carried out with the centrifuge at 5000 rpm. At the same time as the oils extracted with the experimental centrifuge, among all, the products extracted under N<sub>2</sub> flow (A1; A2) had a significantly higher water residue (Fig. 12).



**Fig. 12. Waste water content (%). 1: samples with inoculum; 2 samples without inoculation; A: extraction under nitrogen stream; B: extraction with the sealed centrifuge; Ctrl: duct extraction in the air; MO: Oily must; RIF: separation with conventional centrifuge in the oil mill.**

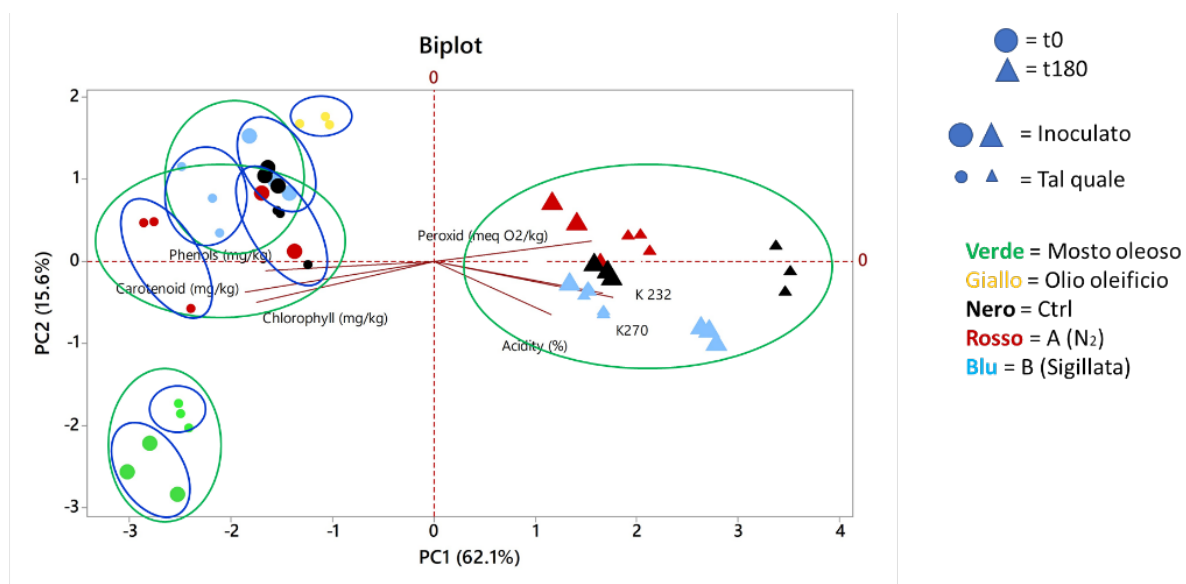
Chemical analyses revealed that the oils fell into the extra virgin category, proving the good quality of the raw material and the extraction procedure. Compared to the acidity values, which were very low (0.2%) and similar to the previous year, the statistical analysis (ANOVA, Tukey HSD) suggested that there was no effect of inoculation or treatments on this parameter, which increased

over time (180 days) in all experimental samples up to about 0.25%. The number of peroxides showed a very precise trend, where at time 0 the effect of the inoculum was not evident, but a variability was observed due to the use of the modified atmosphere, so that the products extracted with N<sub>2</sub> flow had significantly lower values (4.2 mEq O<sub>2</sub> / kg) than those extracted in air (5.5 mEq O<sub>2</sub> / kg). After 180 days of storage, the number of peroxides increased in all samples, especially those extracted from non-inoculated must or extracted from air.



**Fig. 13. Results of the analysis of basic commercial parameters for experimental oils.**

To understand how the investigated parameters and samples were correlated, a multivariate analysis was conducted through principal component analysis (PCA). From the multivariate statistical processing obtained from the correlation matrix of the parameters measured in the products at each sampling, it can be seen that the first two main components explain about 78% of the variance between the samples, separating them according to the treatments and the storage time. Acidity, peroxide number and spectrophotometric indices were inversely correlated with chlorophyll content, carotenoids and total phenolic content. In addition, the analysis allowed graphically to observe a macro separation, both at 24h and 180 days, of the inoculated samples from the control ones. The sample of oil extracted in the oil mill with the conventional centrifuge (5000 rpm) was separated from the experimental samples extracted in the air, recording a greater number of peroxides (6.3 mEq O<sub>2</sub> / kg) and a lower total phenolic content than experimental oils, suggesting that the higher rotation speed can affect the quality characteristics, in particular destabilize the phenolic component.



**Fig. 14.** Biplot (score plot + loading plot) of multivariate statistical processing (PCA) obtained from the correlation matrix with the measured parameters and the products at each sampling.

**Table 4.** Scores assigned to the oils of the cv. Coratina on the basis of the quality level determined in the tests. 1: samples with inoculum; 2 samples without inoculation; A: extraction under nitrogen stream; B: extraction with the sealed centrifuge; Ctrl: extraction conducted in the air.

TESI	TRATTAMENTO	TEMPO	LQ (%)
1	B	0	65,25
1	A	0	64,23
1	CTRL	0	63,35
2	B	0	59,22
2	A	0	58,88
2	RIF	0	58,11
2	CTRL	0	53,81
1	A	180	47,34
2	A	180	46,34
2	B	180	45,06
1	B	180	44,99
2	RIF	180	44,62
1	CTRL	180	44,37
2	CTRL	180	36,91

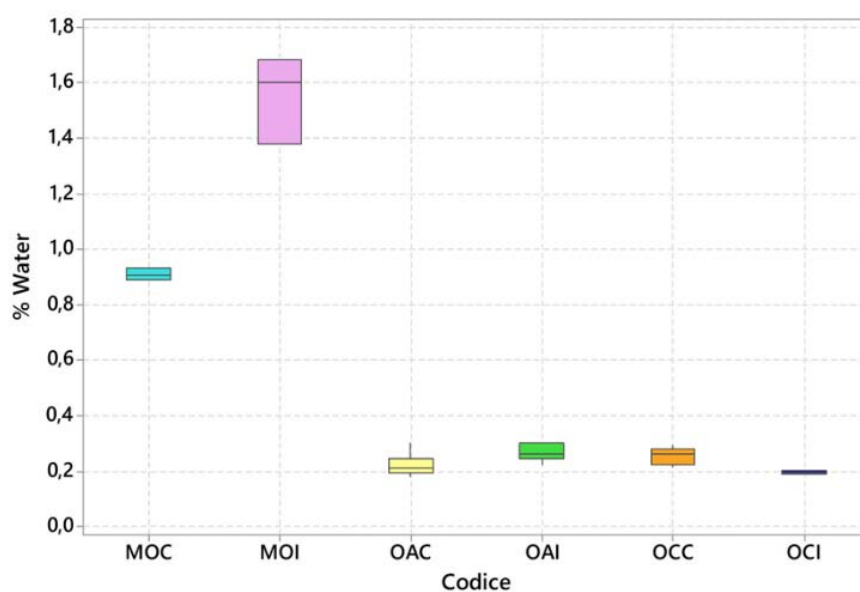
#### CORATINA

The integrated data analysis (Table 4) shows that, together with the extraction time, the products with the inoculum had the highest score (from 63 to 65%) of those not inoculated. An interesting fact that emerged is related to the quality% level of the non-inoculated product extracted in air at low speeds (2 Ctrl, time 0), which was about 5% lower than the control in the oil mill (not inoculated), suggesting that there is an effect of the interaction of the inoculum with the extraction methodology. The % difference after 180 days of storage between experimental samples is about 10%, where samples extracted in nitrogen, both inoculated and not, had a higher score.

The extraction in the air at low revolutions, returned a product after 180 days of extraction of lower quality.

### Activities 2022

Considering the results achieved, in particular the significant effect of inoculation and the use of N<sub>2</sub> during separation at low rpm, the activities in the 4th year (oil campaign November 2022) were set up in order to evaluate the robustness and replicability of the results obtained in previous activities on CV. Coratina. For this purpose, Coratina oily must was supplied at the Cooperativa Sole Di Puglia oil mill (Cerignola, FG). An experimental design was developed that provided for an increase in process replicas for N<sub>2</sub> flow and air extraction treatments (control), with and without inoculation. Parameters indicating the effectiveness of the separation treatment, such as residual water and dissolved oxygen levels, were also measured in the oil samples. The sample of oily must (MO) had a water content of about 0.9%, and after separation, both in air and under N<sub>2</sub> flow, in the samples it was around 0.19%, a value slightly below the maximum threshold indicated by the reference quality standards and similar to that of previous tests.

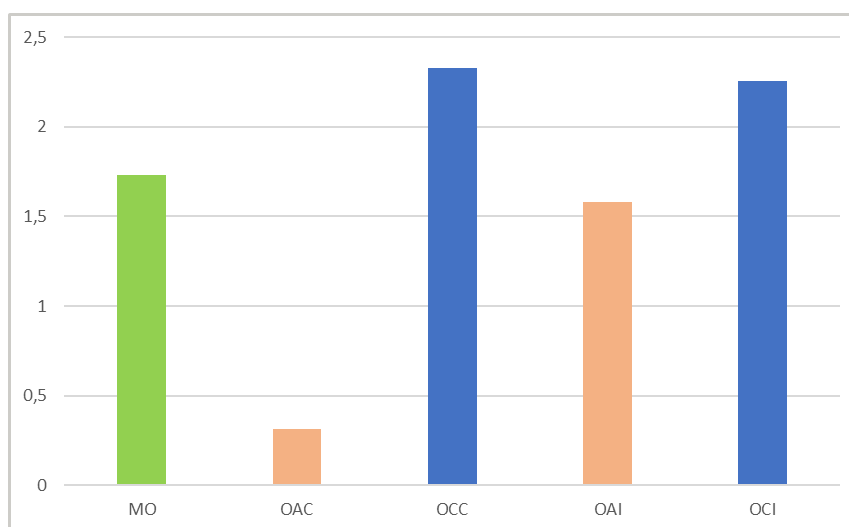


**Fig. 15. Contenuto d'acqua residua nei campioni di olio.**

The analysis of dissolved oxygen detected an oxygen content in the oily must of about 1.7 mg/l and after separation decreased in the samples extracted under N<sub>2</sub> stream up to 0.4 mg/l in the non-inoculated product (OAC) and 1.5 mg/l in the inoculated product (OAI) (Fig. 16).

The samples extracted with the reference conditions (in air), both with (OCI) and without inoculum (OCC), had an increased residual oxygen value compared to the oily must and between 2 and 2.5 mg/l. This analysis suggests that some of the oxygen dissolved in the oily wort was contained in the aqueous phase, which was separated from the oil by centrifugation. However, centrifugation when carried out in air maximized the dissolution of oxygen in the oil phase, resulting in higher

values in oils than in an extraction under flow of N<sub>2</sub>. Chemical analyses conducted after 24 hours in the laboratory also revealed a significant reduction in the number of peroxides in oils extracted under N<sub>2</sub> stream (8-8.5 mEq O<sub>2</sub>/kg), with and without inoculation, compared to control samples extracted in air (9-9.5 mEq O<sub>2</sub>/kg). The acidity values recorded in the oil samples after extraction (24h) were significantly higher (values between 0.4 and 0.45%) than the values on the same hp. obtained in previous years (about 0.2%), probably due to the more extreme pedoclimatic conditions that led to an early maturation and greater susceptibility of the drupes to pest attacks, however a significant effect of the interaction of the inoculum variable with the modified atmosphere was evident, so the samples with the inoculum had lower acidity values, especially if extracted with N<sub>2</sub>.



**Fig. 16. Dissolved oxygen (mg/l) in test samples. MO: Oily must; A: nitrogen extraction; C: Extraction in air; I: inoculated product; C: product not inoculated.**

### **Concluding remarks on the prototype low-speed modified atmosphere separator (SAM)**

The clarification with SAM, both under nitrogen flow and in the absence of incoming oxygen, preserves the most important chemical properties of the oil, improving its quality and also stability from 4% up to 20% compared to the centrifuge in the oil mill, with a variability determined by the cultivar and oil mill.

The use of the experimental inoculum improves the level of oxidative quality of the oil, opening a new scenario on the possibility and method of use in the process (when should it be inoculated?).

The results suggest that the oil clarification process has room for improvement so it is appropriate to further investigate the effect of gaseous mixtures and their interaction with the rotation speed of the centrifuge and the water content on the characteristics of the product.

In the light of the results obtained, it is necessary to evaluate the intensity to be applied to the clarification process according to the water content of the product, also aiming at energy sustainability.

## References

- [1] Visioli F., Bellomo G., Montedoro G.F., Galli C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*. 117: 25-32.
- [2] Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Montedoro G.F., Zappia V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.*; 10(3): 159-165.
- [3] Velasco J., Dobarganes C. (2002). "Oxidative stability of virgin olive oil" *Eur. J Lipid Sci. Technol.*, 104,661-676.
- [4] Visioli F., Bellosta S., Galli C. (1998). "Oleuropein, the bitter principle of olives, increases nitric oxide production from mouse macrophages". *Life Sci.*, 62, 451-456.
- [5] Montedoro G.F., Baldioli M., Servili M. (1992). I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica. *Giornale Ital. Nutriz. Clinica e Preventiva*. 1(1): 19-32.
- [6] Morales M. T., Alonso M. V., Rios J. J., Aparicio R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*; 43(11): 2925-2931.
- [7] Angerosa F., Di Giacinto L., d'Alessandro N. (1997). Quantitation of some flavor components responsible for the 'green' attributes in virgin olive oils. *J. High. Resol. Chromatogr*. 20(9): 507-510.
- [8] Aparicio R., Morales M.T., Alonso M.V. (1996). Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(10): 1253-1264.
- [9] Di Giovacchino L. (2012). Separazione finale dell'olio vergine da stoccare e imbottigliare. *Ricerca olio*, pag. 28-32.
- [10] Masella P., Parenti A., Spugnoli P., Calamai L. (2009). Influence of Vertical Centrifugation on Extra Virgin Olive Oil Quality. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1137-1140.
- [11] Reg. CEE 2568 della commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti.
- [12] Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oils, COI/T.15/NC No 3/Rev. 13 June 2019

---

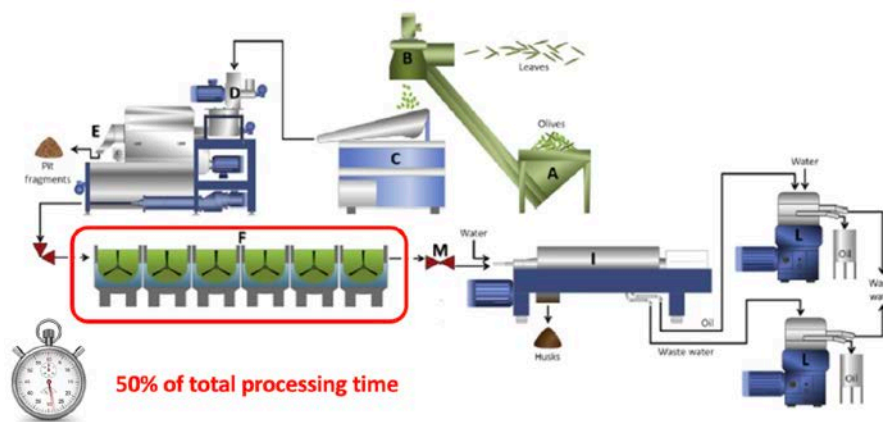
## Applicazione della tecnologia ad ultrasuoni ad alta potenza per il miglioramento del processo di estrazione degli olii vergini di oliva

---

*Roberto Romaniello\**

*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimenti, Risorse Naturali e Ingegneria (DAFNE), Università degli Studi di Foggia*

Il processo di estrazione degli olii vergini d'oliva è, nella gran parte dei casi e nell'ottica dell'ottenimento di prodotti di qualità, condotto mediante l'utilizzo di macchine poste in sequenza che consentono di ottenere l'olio mediante un processo continuo e che utilizzi solo operazioni meccaniche (figura 1). Le singole operazioni unitarie constano di: deramifogliatura delle olive in ingresso (fig. 1-A); lavaggio (fig. 1-C); frangitura (fig. 1-D); gramolazione (fig. 1-F); centrifugazione solido-liquido (fig. 1-I); centrifugazione liquido-liquido (fig. 1-L). Di fatto, le macchine enunciate lavorano in continuo tranne la macchina gramolatrice. Quest'ultima necessita di operare sulla pasta olearia, ottenuta dalla frangitura, per un tempo variabile tra i 20 e i 40 minuti. Il tempo medio di operazione della gramolatrice è pari a circa il 50% del tempo totale di processo.

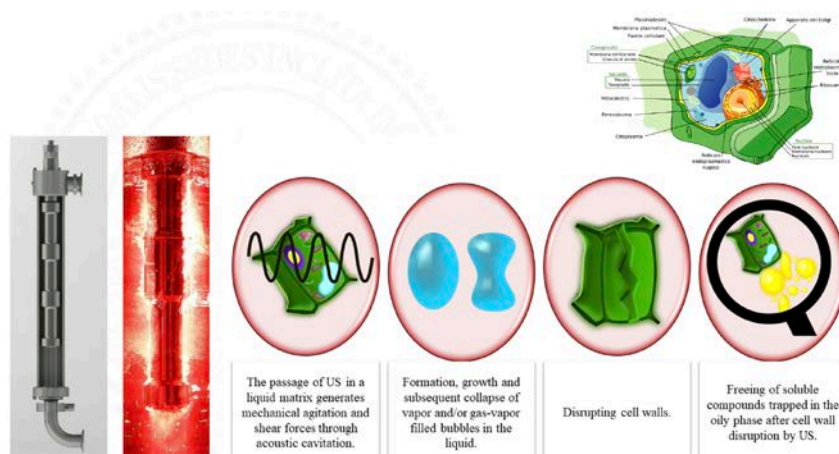


**Figura 1. Schema di un processo continuo di estrazione degli olii vergini d'oliva.**

L'operazione di gramolazione è estremamente delicata in quanto nel tempo di operazione la pasta olearia subisce un condizionamento meccanico, dovuto al lento rimescolamento operato da un aspo, e da un condizionamento termico operato mediante trasferimento di calore da un fluido di servizio (acqua) circolante nell'intercapedine presente nella parete esterna della macchina. In questa fase si ottengono due effetti sulla pasta di olive, ovvero la riduzione di viscosità, utile alla successiva fase di centrifugazione, e la promozione di reazioni biochimiche atte alla produzione di sostanze aromatiche e volatili. Il punto di debolezza di questa fase è l'opportunità di avere disformità di riscaldamento della pasta di olive, con differenze di temperatura registrate tra il centro

di massa e le sezioni periferiche. Una disattenta conduzione dell'operazione di gramolazione potrebbe, quindi, portare a danneggiamenti qualitativi irreversibili alla pasta di olive.

L'obiettivo del WP 2.1 del progetto ITI4NUEVOO è stato quello di migliorare la fase di condizionamento della pasta di olive, al fine di migliorare la resa di estrazione, ridurre il tempo di gramolazione e quindi ridurre le problematiche ad essa ricondotte, e aumentare il contenuto di sostanze nutraceutiche dell'olio ottenuto. Il raggiungimento di questi obiettivi è stato possibile ottenerlo grazie all'applicazione della tecnologia ad ultrasuoni ad alta potenza, in fase di condizionamento della pasta di olive. L'idea alla base dell'utilizzo di tale macchina è scaturita dal fatto che gli ultrasuoni a bassa frequenza generano il fenomeno della cavitazione nei fluidi nei quali agiscono. In particolare, la cella di processo è composta da un tubo in acciaio entro il quale è inserito una sonda in titanio, con opportuna geometria, la quale funge da trasduttore delle onde meccaniche ultrasoniche generate da un generatore di ultrasuoni posto alla sommità di essa. In figura 2 sono visibili, da sinistra, l'immagine in spaccato della cella di processo con il trasduttore al suo interno. Accanto, vi è un'immagine radiografica della cella di processo durante la fase operative, ovvero durante il passaggio al suo interno della pasta olearia. Le zone chiare mostrano le porzioni di pasta olearia investite dalle onde meccaniche e indicano l'instaurarsi del fenomeno della cavitazione.



**Figura 2. Il fenomeno della cavitazione generato dalla cella ad ultrasuoni.**

La cavitazione si esprime nella trasmissione delle onde meccaniche all'interno della matrice vegetale, in particolare dei vacuoli (ricostruzione nella parte alta della figura 2), determinando la formazione, crescita e collasso di bolle di vapor d'acqua immerse nel liquido cellulare. Quest'azione determina la rottura delle membrane cellulari, nello specifico le membrane dei vacuoli, con la fuoriuscita dell'olio ivi contenuto.

Nell'arco dei tre anni di progetto sono state condotte numerose prove comparative per valutare l'applicabilità della tecnologia ad ultrasuoni a bassa frequenza nell'ambito dell'estrazione olearia. La macchina ad ultrasuoni utilizzata è stata fornita dall'azienda Seneco s.r.l. (Milano, Italia) concessionaria esclusiva per il settore "olio" della Hielscher Ultrasonics GmbH.

In figura 3a è mostrata la versione definitiva della macchina, divenuta commerciale dopo le prove condotte nell'ambito del progetto, costituita da una cella con 4 trasduttori (sonotrodi)

all'interno di essa. La macchina è alimentata da un numero di alimentatori pari al numero di sonotrodi installati ed è gestita da un PLC (figura 4). La gestione da parte del PLC riguarda la regolazione automatica dell'intensità e dell'ampiezza della vibrazione, sulla base della portata in massa della pasta di olive in ingresso e della pressione rilevata in uscita dalla cella di trattamento (indicativa della pressione della pasta all'interno della cella). Le caratteristiche peculiari della macchina sono:

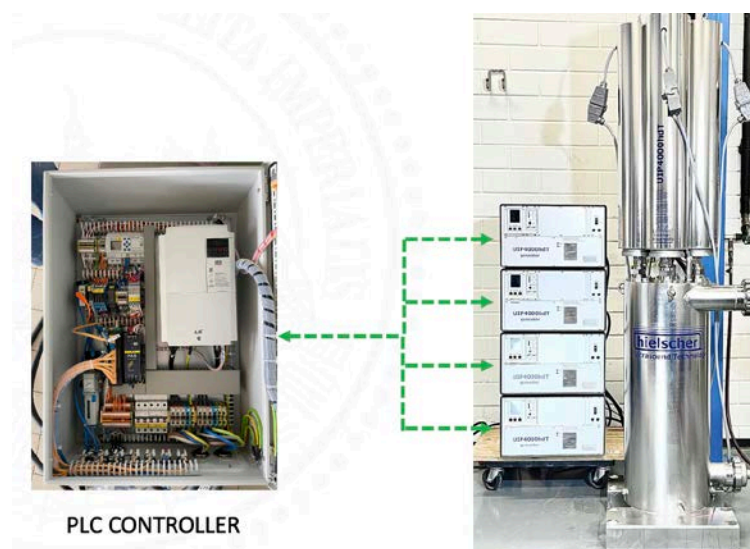
- Portata in massa massima: 15 tonnellate /h;
- Potenza massima assorbita: 4 kW/modulo;
- Energia specifica trasferita: 1.8 – 7.2 kJ/kg;
- Predisposta per il controllo e gestione da remoto (tecnologia 4.0).

È inoltre presente un sistema di blocco automatico in caso di arresto dell'alimentazione della pasta di olive, al fine di proteggere il sonotrodo che si lesionerebbe in caso di funzionamento a vuoto.

In figura 6 il dettaglio della pinch-valve per la modulazione della pressione nella cella.



**Figura 3. Macchina ad ultrasuoni multi-sonotrodo.**

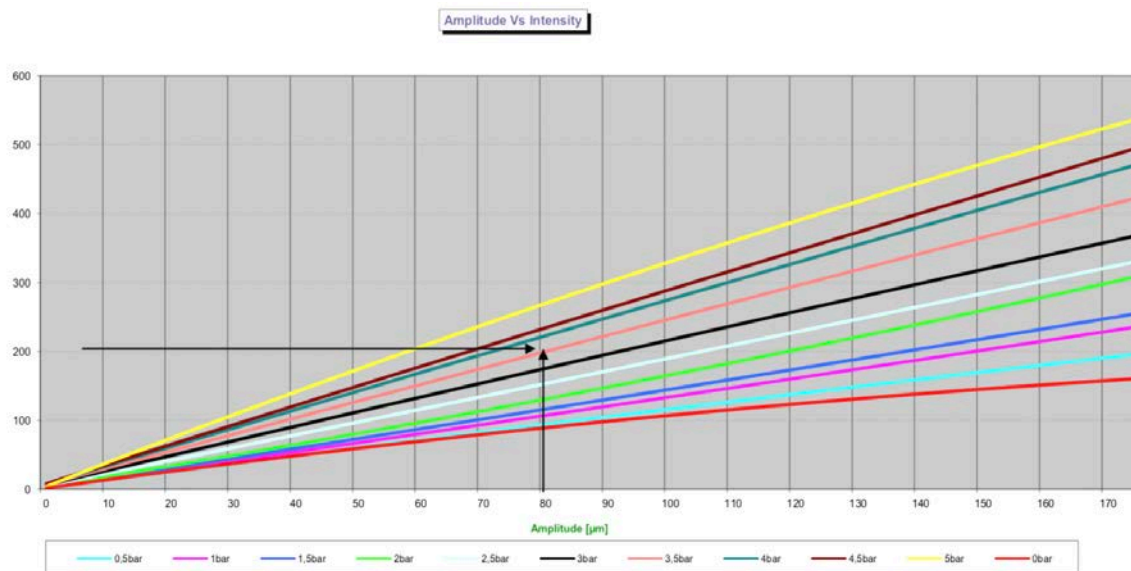


**Figura 4. Sistema di controllo della macchina ad ultrasuoni.**



**Figura 6. Dettaglio delle sezioni d'ingresso e di uscita della pasta di olive e dei quattro sonotrodi con i rispettivi generatori di ultrasuoni.**

La determinazione della pressione ottimale all'interno della cella di trattamento è stato un punto chiave della sperimentazione. In particolare, tramite la valutazione degli effetti sulla pasta olearia è stato ricercato il valore ottimale di Ampiezza della vibrazione ed intensità, come mostrato in figura 7.

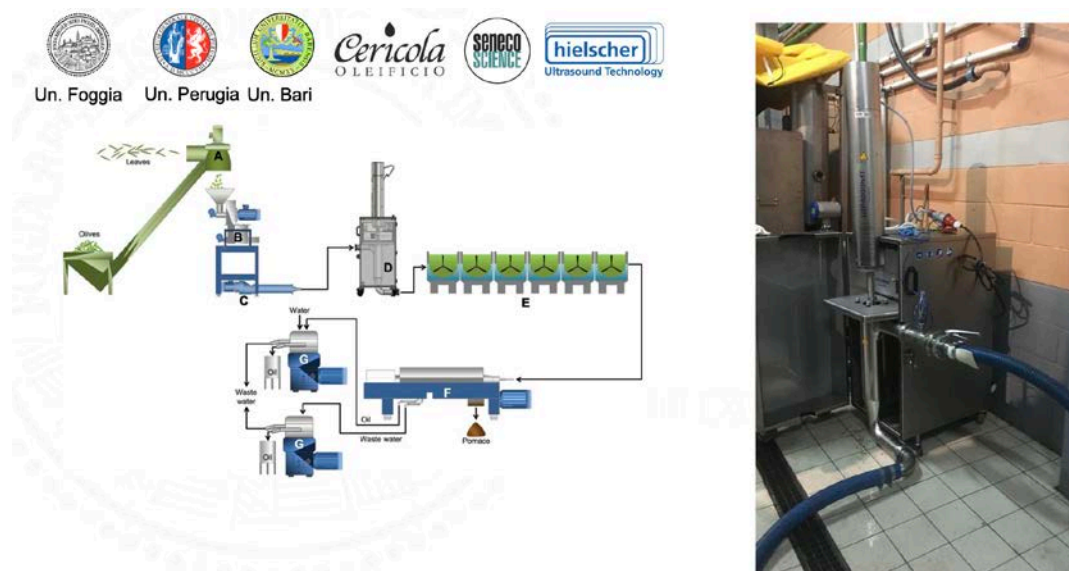


**Figura 7. Rette Amplitudine-intensità, in dipendenza di diverse pressioni di esercizio.**

La pressione ottimale per avere un trattamento efficace è risultata essere compresa tra 2.8 e 3.4 bar. La pasta di olive necessita di essere in intimo contatto con il sonotrodo al fine di ricevere le vibrazioni meccaniche necessarie ad innescare il fenomeno della cavitazione. Per cui, è stato

sviluppato un sistema di controllo e regolazione della pressione basato su una valvola meccanica a membrana e uno specifico software gestito dal PLC.

Le prove sperimentali comparative sono iniziate nella campagna olearia 2019-2020, con una macchina ad ultrasuoni a singolo sonotrodo. La macchina è stata installata in un impianto industriale di estrazione alla periferia di Foggia (Oleificio Cericola Emilia, B.go Incoronata (FG)). Il layout dell'impianto è mostrato in figura 8.



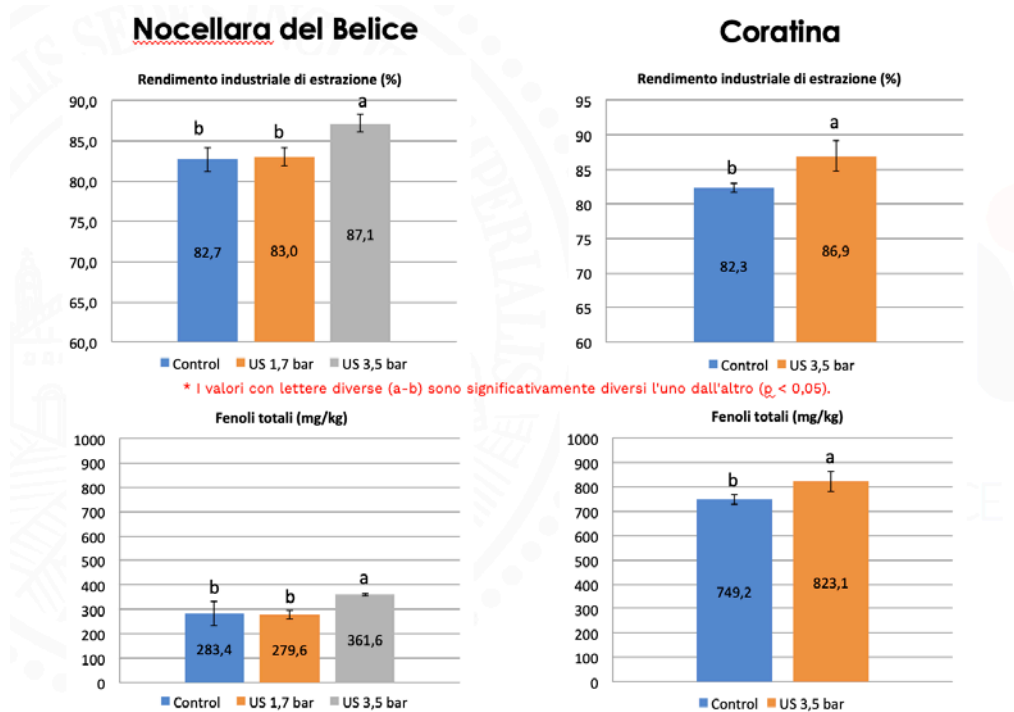
**Figura 8. Installazione della macchina ad ultrasuoni presso l'oleificio Cericola Emilia (FG).**

La macchina è stata installata in linea, tra la sezione di frangitura e quella di gramolazione. La portata oraria dell'impianto è stata impostata a 2.5 ton/h e la gramolazione successiva è stata condotta per 30 minuti a 27 °C. I parametri della macchina ad ultrasuoni, invece, sono stati fissati a 4 kW di potenza e a 20 kHz di frequenza di vibrazione sul sonotrodo. Inoltre, in questa prima sperimentazione è stata presa in considerazione la valutazione degli effetti della pressione di esercizio; per cui sono state testate due pressioni di lavoro differenti: 1.7 e 3.5 bar. Le cultivar sulle quali sono state eseguite le prove di funzionalità sono state: Arbequina; Peranzana; Nocellara del Belice; Coratina, con l'impiego totale di circa 150 tonnellate di olive lavorate.

I primi risultati ottenuti sono mostrati in figura 9, 10 e 11, inerenti solamente le due Cultivar Nocellara del Belice e Coratina. L'esclusione delle altre due cultivar è scaturita dal fatto che le prove condotte su esse non hanno avuto esito positivo, per via delle prove di messa a punto del sistema e di fallimenti dovuti a iniziali problematiche riscontrate.

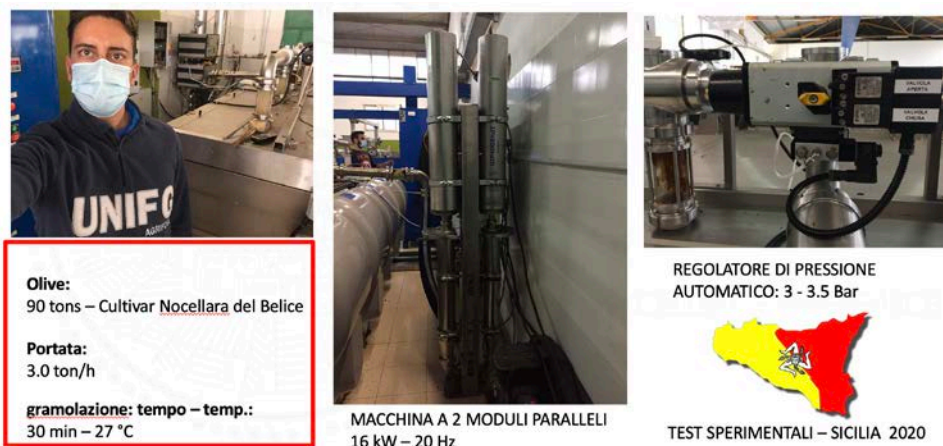
Ai fini delle valutazioni qualitative, si è visto come il rendimento industriale di estrazione (rapporto percentuale tra la quantità di olio ottenuto e le quantità di olio effettivamente presente nelle olive) ha avuto incrementi significativi quando è stata utilizzata la macchina ad ultrasuoni e, in particolare, quando la pressione di esercizio utilizzata è stata 3.5 bar. Difatti, la bassa pressione (1.7 bar nella prova condotta), non ha prodotto risultati apprezzabili. Dal punto di vista qualitativo, i

risultati hanno registrato la stessa tendenza. Incrementi significativi di fenoli totali sono stati registrati per entrambe le cultivar, sempre considerando la pressione di esercizio più alta tra le due indagate.



**Figura 9. Risultati delle prove comparative presso l'Oleificio Cericola, per le Cultivar Nocellara del Belice e Coratina.**

Nella stessa campagna olearia, in piena pandemia COVID, altre prove sperimentali comparative sono state condotte in un frantoio della provincia di Agrigento (Oleificio Palermo). In questo frangente è stata testata una nuova configurazione della macchina ad ultrasuoni, ovvero la configurazione in parallelo di due sonde (Figura 10). Inoltre, è stata installata una valvola regolatrice proporzionale all'uscita della macchina al fine di controllare il livello di pressione.



**Figura 10. Prove sperimentali presso l'oleificio Palermo (Agrigento).**

Le condizioni di processo sono state, in questo caso: Portata in massa pari a 3 ton/h; gramolazione per 30 minuti a 27 °C. La cultivar di olive utilizzata è stata la Nocellara del Belice, per un totale di olive lavorate pari a 90 tonnellate. I parametri della macchina ad ultrasuoni sono stati: 16 kW di potenza elettrica e 20 kHz di frequenza al sonotrodo.

Nell'anno 2021 è stata sviluppata l'idea di inserire più sonotrodi nella cella di processo, inserendo all'interno della nuova macchina tutte le soluzioni testate nelle campagne precedenti. Nel periodo ottobre – dicembre 2021 sono state eseguite nuove prove comparative utilizzando la macchina definitiva, con quattro sonotrodi e tutti i sistemi di automazione per il controllo della portata e della pressione nella cella di processo. Le prove sono state eseguite presso il frantoio Malerba (Terlizzi, BA), processando olive della cultivar Coratina (figura 11). Sono state lavorate circa 200 tonnellate di olive ad una portata oraria variabile tra 7 e 9 ton/h. I parametri di gramolazione sono stati mantenuti ai livelli delle prove precedenti, ovvero 30 min a 27 °C. I parametri della macchina ad ultrasuoni sono stati impostati in modo da consentire un assorbimento massimo pari a 16 kW (4 kW per sonotrodo) e frequenza di oscillazione di 20 kHz.

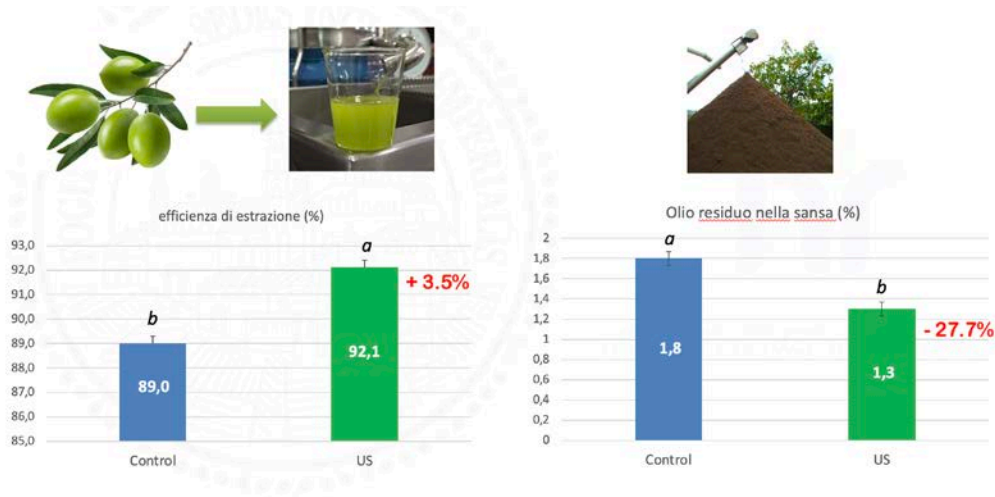


**Figura 11. Prove sperimentali presso l'oleificio Malerba (Terlizzi – BA).**

I risultati quantitativi e qualitativi ottenuti con l'utilizzo della macchina a 4 sonotrodi hanno mostrato sensibili differenze rispetto a quelli ottenuti dall'estrazione convenzionale.

I parametri quantitativi (figura 12) sono stati molto positivi. Come illustrato nella figura 12, sia il valore di estraibilità che il valore di olio residuo nella sansa sono risultati rispettivamente più alti e più bassi a livello significativo ( $p < 0.05$ ).

A livello qualitativo, gli ultrasuoni a bassa frequenza hanno mostrato la capacità di incrementare significativamente il valore di fenoli totali, conferendo all'olio una maggiore capacità antiossidante e protettiva (figura 13). Inoltre, anche l'oleuropeina è incrementata significativamente con l'uso degli ultrasuoni, dimostrato anche dall'aumento del 3.4-DHPEA-EDA, che è un suo precursore.



**Figura 12. Risultati quantitativi delle prove di estrazione della campagna olearia 2021.**

In definitiva, la tecnologia ad ultrasuoni a bassa frequenza ha mostrato il miglioramento quali-quantitativo dell'olio ottenuto, centrando gli obiettivi di progetto. Ulteriori prove comparative sono in programma nell'annata corrente e futura per la regolazione fine dei parametri di processo in modo da aumentare la stabilità dei dati e una migliore gestione dei parametri di macchina.

I dati delle sperimentazioni e delle analisi chimico-fisiche eseguite, sono stati pubblicati su quattro articoli scientifici, ad alto impatto. Il primo dei quattro articoli attiene a prove preliminari eseguite prima dell'inizio del progetto ITI4NUEVOO, e fa parte della prosecuzione di una precedente ricerca iniziata con il team di ricerca Australiano del centro di ricerca governativo CSIRO.

Si intende ringraziare il gruppo di ricerca di Meccanica Agraria di Bari per il supporto relativo alle prove sperimentali e di Scienze e Tecnologie Alimentari di Perugia per le analisi chimiche condotte sugli olii ottenuti.



**Figura 13. Pubblicazioni scientifiche.**

---

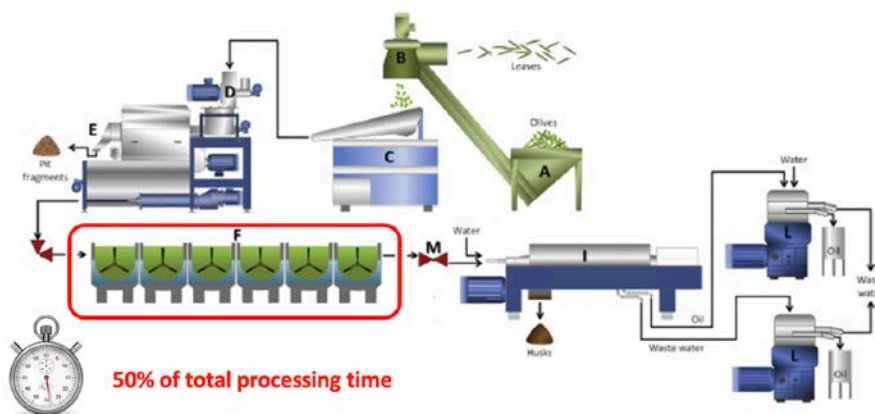
## Application of high-power ultrasound technology for improving the extraction process of virgin olive oils

---

*Roberto Romaniello\**

*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimenti, Risorse Naturali e Ingegneria (DAFNE), Università degli Studi di Foggia*

The extraction process of virgin olive oils is, in most cases and with a view to obtaining quality products, conducted using machines placed in sequence that allow the oil to be obtained through a continuous process using only mechanical operations (Figure 1). The individual unit operations consist of defoliator of the incoming olives (Fig. 1-A); washing (Fig. 1-C); crushing (Fig. 1-D); malaxing (Fig. 1-F); solid-liquid centrifugation (Fig. 1-I); and liquid-liquid centrifugation (Fig. 1-L). In fact, the enunciated machines operate continuously except for the malaxer machine. The latter needs to operate on the oil paste, obtained from crushing, for between 20 and 40 minutes. The average operation time of the malaxer machine is about 50 percent of the total process time.

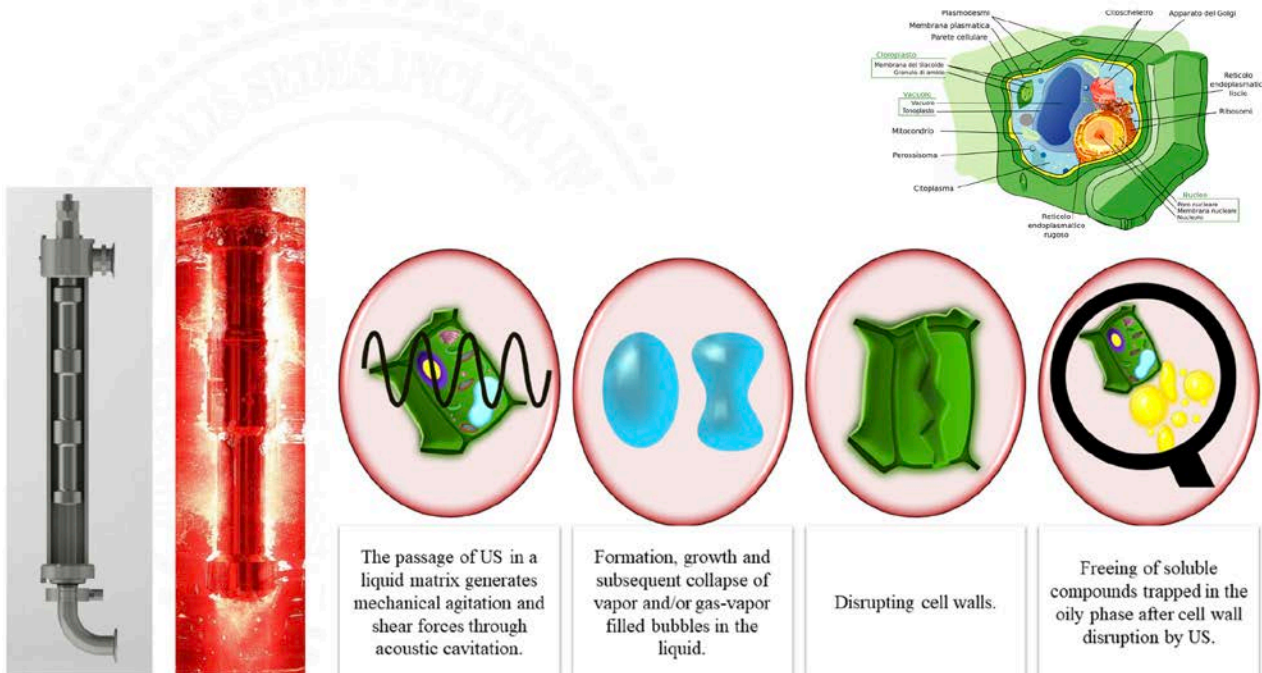


**Figure 1. Schematic diagram of a continuous virgin olive oil extraction process.**

The malaxing operation is extremely delicate because during the operation time the olive paste undergoes mechanical conditioning, due to slow stirring operated by a reel, and thermal conditioning operated by heat transfer from a service fluid (water) circulating in the cavity present in the outer wall of the machine. Two effects on the olive paste are obtained in this phase, namely, the reduction of viscosity, useful for the subsequent centrifugation phase, and the promotion of biochemical reactions suitable to produce aromatic and volatile substances. The weakness of this stage is the opportunity to have heating deformities in the olive paste, with temperature differences recorded between the center of mass and the peripheral sections. Careless conduct of the kneading operation could, therefore, lead to irreversible quality damage to the olive paste.

The objective of WP 2.1 of the ITI4NUEVOO project was to improve the olive paste conditioning stage, to improve the extraction yield, reduce the malaxing time and thus reduce the problems attributed to it, and increase the nutraceutical content of the oil obtained. It was possible to achieve these goals through the application of high-power ultrasonic technology during the olive paste conditioning stage. The idea behind the use of such a machine arose from the fact that low-frequency ultrasound generates the phenomenon of cavitation in the fluids in which it

acts. Specifically, the process cell consists of a steel tube within which is inserted a titanium probe, with appropriate geometry, which acts as a transducer of the ultrasonic mechanical waves generated by an ultrasonic generator placed at the top of it. Figure 2 shows, from the left, the cutaway image of the process cell with the transducer inside it. Next to it, there is an X-ray image of the process cell during the operational phase, that is, during the passage of the oil paste inside it. The light areas show the portions of the oil paste invested by the mechanical waves and indicate the establishment of the cavitation phenomenon.



**Figure 2. The phenomenon of cavitation generated by the ultrasonic cell.**

Cavitation is expressed in the transmission of mechanical waves within the plant matrix, specifically the vacuoles (reconstruction at the top of Figure 2), resulting in the formation, growth and collapse of water vapor bubbles immersed in the cell liquid. This action results in the rupture of the cell membranes, specifically the vacuole membranes, with the escape of the oil contained therein.

Over the three-year project period, numerous comparative tests were conducted to evaluate the applicability of low-frequency ultrasonic technology in oil extraction. The ultrasonic machine used was supplied by Seneco s.r.l. (Milan, Italy) the exclusive dealer for the "oil" sector of Hielscher Ultrasonics GmbH.

Figure 3a shows the final version of the machine, which became commercial after the tests conducted as part of the project, consisting of a cell with 4 transducers (sonotrodes) inside it. The machine is powered by a number of power supplies equal to the number of sonotrodes installed and is managed by a PLC (Figure 4). The management by the PLC concerns the automatic adjustment of the intensity and amplitude of the vibration, based on the mass flow rate of the incoming olive paste and the pressure detected at the outlet of the treatment cell (indicative of the pressure of the paste inside the cell). The special features of the machine are:

- Maximum mass flow rate: 15 tons/h;
- Maximum power input: 4 kW/module;
- Specific energy transferred: 1.8 to 7.2 kJ/kg;
- Prepared for remote control and management (4.0 technology).

There is also an automatic blocking system in case the olive paste feeding stops, in order to protect the sonotrode that would be damaged in case of no-load operation. Figure 6 shows the detail of the pinch-valve for pressure modulation in the cell.



Figure 3. Hi-Power Ultrasound machine having 4 sonotrodes.

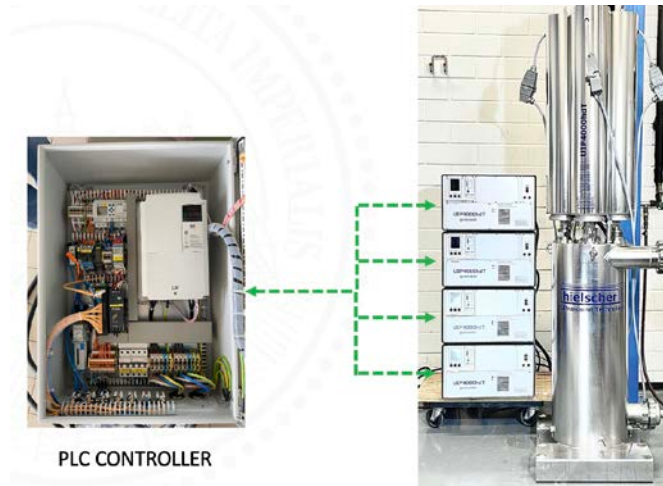
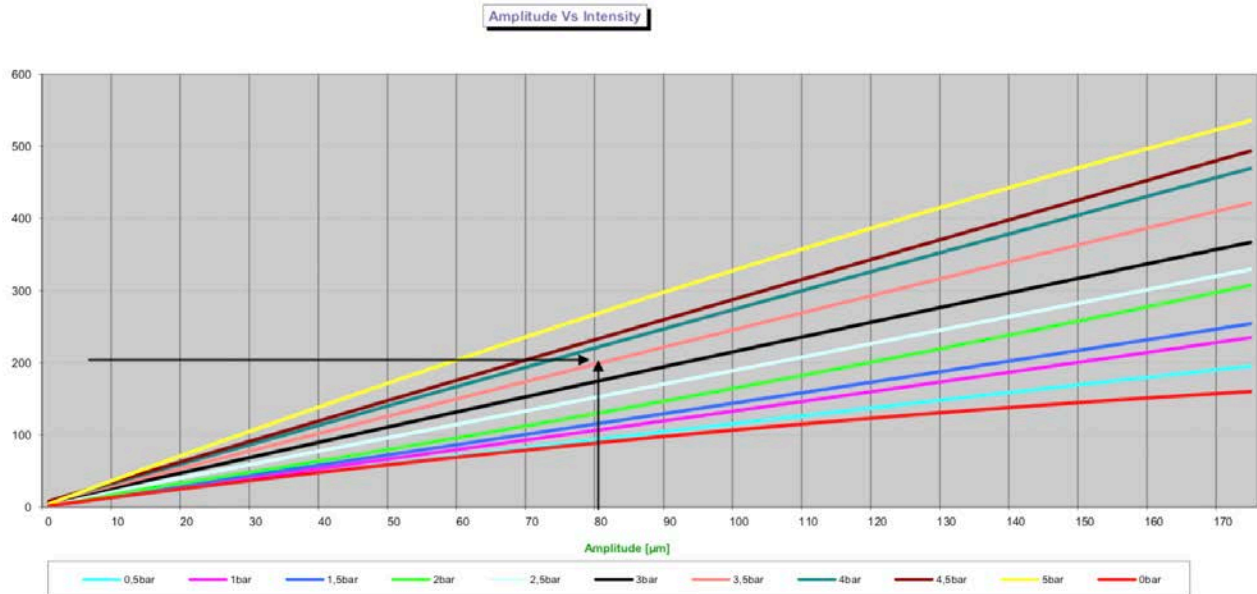


Figure 4. Control Unit of Ultrasound machine.



Figure 6. Detail of the inlet and outlet sections of the olive paste and the four sonotrodes with their respective ultrasonic generators.

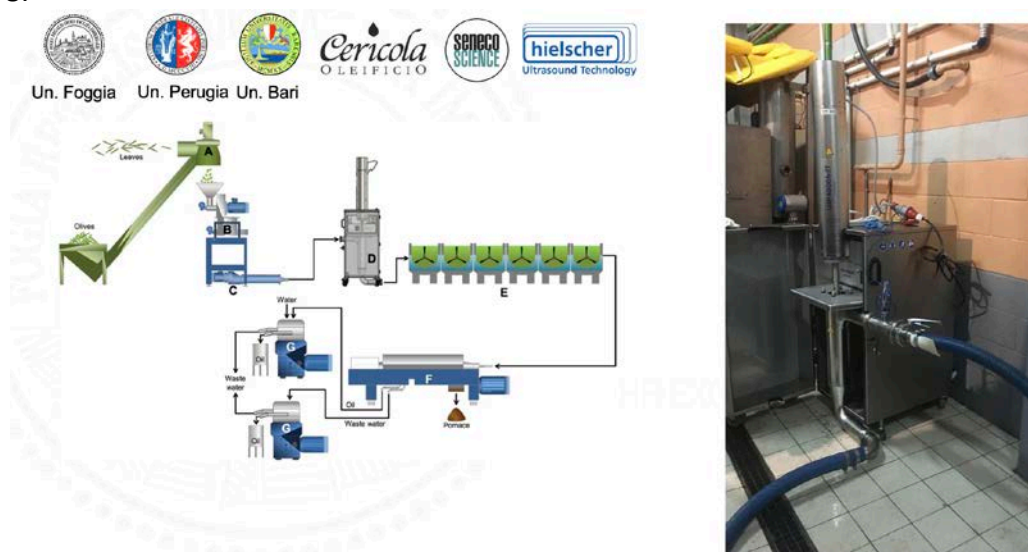
Determining the optimal pressure within the treatment cell was a key point of the experimentation. Specifically, through the evaluation of the effects on the olive paste, the optimal value of Vibration Amplitude and intensity was sought, as shown in Figure 7.



**Figure 7. Amplitude-intensity straight lines, depending on different operating pressures.**

The optimum pressure to have an effective treatment was found to be between 2.8 and 3.4 bar. The olive paste needs to be in intimate contact with the sonotrode to receive the mechanical vibrations necessary to trigger the cavitation phenomenon. Therefore, a pressure control and regulation system were developed based on a mechanical diaphragm valve and specific software managed by the PLC.

Comparative experimental trials began in the 2019-2020 oil campaign with a single sonotrode ultrasonic machine. The machine was installed in an industrial extraction plant on the outskirts of Foggia (Oleificio Cericola Emilia, B.go Incoronata (FG)). The layout of the plant is shown in Figure 8.

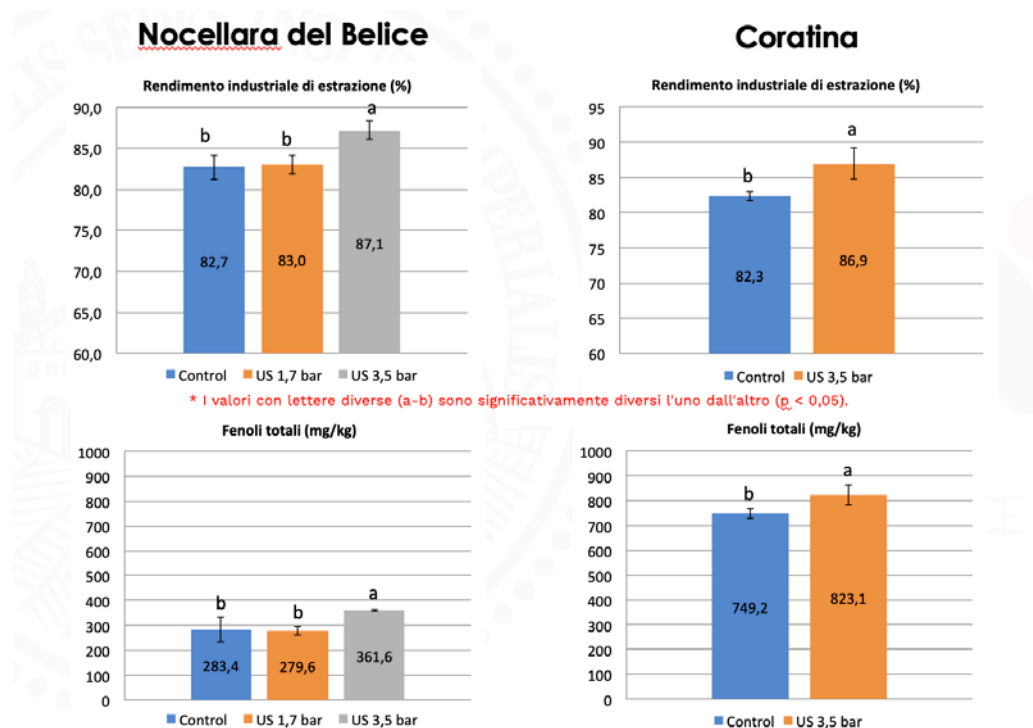


**Figure 8. Installation of the ultrasonic machine at the Cericola Emilia oil mill (FG).**

The machine was installed in-line, between the crushing and the malaxing sections. The mass flow rate of the machine was set at 2.5 ton/h, and subsequent malaxation was conducted for

30 minutes at 27 °C. The parameters of the ultrasonic machine, on the other hand, were set at 4 kW power and 20 kHz vibration frequency on the sonotrode. In addition, evaluation of the effects of working pressure was considered in this first experiment; therefore, two different working pressures were tested: 1.7 and 3.5 bar. The cultivars on which the functionality tests were performed were: Arbequina; Peranzana; Nocellara del Belice; Coratina, with the total use of about 150 tons of processed olives.

The initial results obtained are shown in Figures 9, 10 and 11, concerning only the two cultivars Nocellara del Belice and Coratina. The exclusion of the other two cultivars stemmed from the fact that the trials conducted on them were unsuccessful, due to trials to fine-tune the system and failures due to initial problems encountered.



**Figure 9. Results of comparative tests at Oleificio Cericola, for the Nocellara del Belice and Coratina cultivars.**

For the purposes of quality evaluations, it was seen that the industrial extraction yield (percentage ratio between the quantity of oil obtained and the quantities of oil present in the olives) had significant increases when the ultrasound machine was used and, in particular, when the operating pressure used was 3.5 bar. In fact, the low pressure (1.7 bar in the test conducted), did not produce appreciable results. Qualitatively, the results showed the same trend. Significant increases in total phenols were recorded for both cultivars, again considering the higher operating pressure among the two investigated.

In the same oil campaign, at the height of the COVID pandemic, other comparative experimental trials were conducted in an olive mill in the province of Agrigento (Oleificio Palermo). At this juncture, a new configuration of the ultrasonic machine was tested, namely the parallel configuration of two probes (Figure 10). In addition, a proportional regulating valve was installed at the output of the machine to control the pressure level.



**Figure 10. Experimental tests at the Palermo's oil mill (Agrigento)**

The processing conditions were, in this case: mass flow rate equal to 3 tons/h; kneading for 30 minutes at 27 °C. The olive cultivar used was Nocellara del Belice, with total olives processed equal to 90 tons. The parameters of the ultrasonic machine were: 16 kW electrical power and 20 kHz sonotrode frequency.

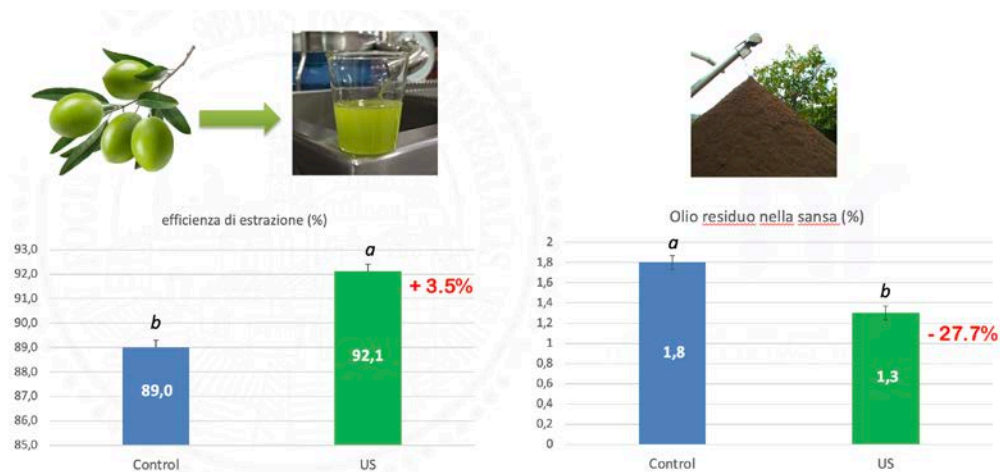
In the year 2021, the idea of including more sonotrodes in the process cell was developed, incorporating within the new machine all the solutions tested in previous campaigns. In October-December 2021, new comparative tests were performed using the final machine with four sonotrodes and all automation systems for flow rate and pressure control in the process cell. The tests were carried out at the Malerba oil mill (Terlizzi, BA), processing olives of the Coratina cultivar (Figure 11). About 200 tons of olives were processed at an hourly flow rate ranging from 7 to 9 tons/h. Malaxation parameters were maintained at the levels of previous trials, i.e., 30 min at 27 °C. The ultrasonic machine parameters were set to allow a maximum power consumption of 16 kW (4 kW per sonotrode) and oscillation frequency of 20 kHz.



**Figure 11. Experimental tests at the Malerba oil mill (Terlizzi - BA).**

Quantitative and quantitative results obtained using the 4-sonotrode machine showed significant differences from those obtained by conventional extraction.

The quantitative parameters (Figure 12) were very positive. As shown in Figure 12, both the extractability value and the residual oil value in pomace were respectively higher and lower at a significant level ( $p < 0.05$ ).



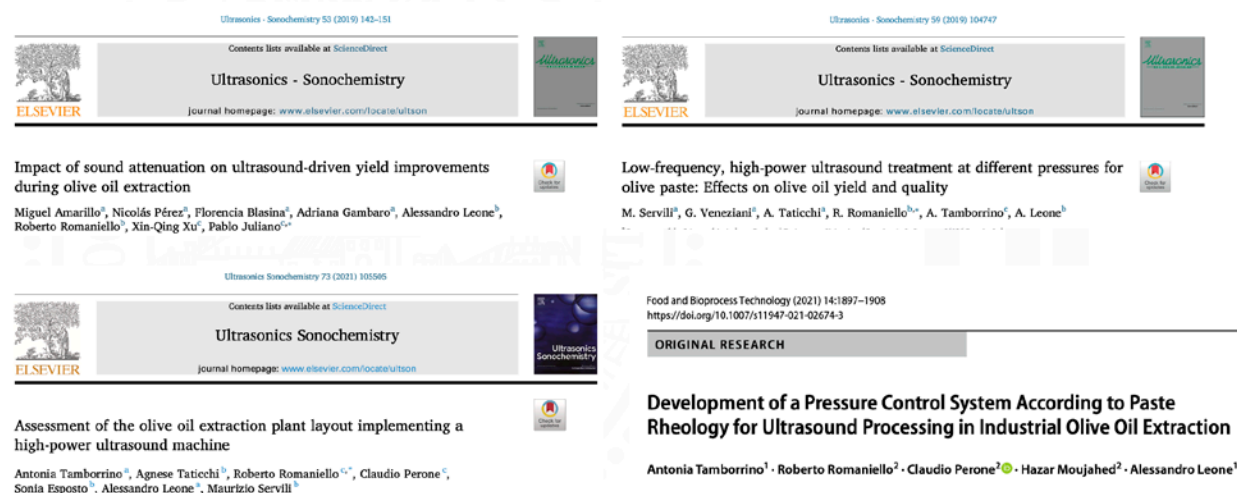
**Figure 12. Quantitative results of the 2021 oil campaign extraction tests.**

At the qualitative level, low-frequency ultrasound showed the ability to significantly increase the value of total phenolics, giving the oil greater antioxidant and protective capacity (Figure 13). In addition, oleuropein also increased significantly with the use of ultrasound, also demonstrated by the increase in 3.4-DHPEA-EDA, which is its precursor.

Ultimately, the low-frequency ultrasound technology showed the qualitative-quantitative improvement of the oil obtained, centering the project objectives. Further comparative trials are planned in the current and future vintage to fine-tune process parameters to increase data stability and better management of machine parameters.

Data from the experiments and chemical-physical analyses performed, have been published in four scientific, high-impact articles. The first of the four articles pertain to preliminary tests performed prior to the start of the ITI4NUEVOO project, and is part of the continuation of an earlier research initiated with the Australian research team from the CSIRO government research center.

It is intended to thank the research group of Agricultural Mechanics of Bari for support related to the experimental trials and Food Science and Technology of Perugia for the chemical analyses conducted on the oils obtained.



**Figure 13. Scientific papers.**



---

# Selezione e impiego di microrganismi per la produzione di olio extravergine di oliva con caratteristiche nutrizionali migliorate

---

*Teresa Zotta\*, Marilisa Giavalisco, Eugenio Parente, Emanuela Lavanga, Annamaria Ricciardi*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

## **Riassunto**

Il microbiota dell'olio d'oliva riflette in parte quello delle olive e può influenzare positivamente o negativamente le caratteristiche chimico-fisiche e sensoriali del prodotto finale.

In questo studio, diversi ceppi di batteri lattici (appartenenti al genere *Lactiplantibacillus*) e lieviti (appartenenti a diversi generi e specie), microrganismi dominanti nel microbiota delle olive, sono stati testati per diverse attività enzimatiche, performance di crescita, tolleranza allo stress, al fine di selezionare ceppi appropriati da utilizzare come inoculo nel mosto oleoso e ottenere un olio extravergine di oliva (EVO) con proprietà chimico-fisiche, organolettiche e nutrizionali migliorate. La fase di screening ha permesso di selezionare i ceppi *Lpb. pentosus* O17 e *Nakazawaea wickerhamii* Y18, sulla base della loro tolleranza ai composti fenolici (mosto oleoso è una matrice ricca di composti fenolici) e per la capacità di idrolizzare l'oleuropeina (il glicoside responsabile del sapore amaro delle olive) e formare idrossitirosolo (un composto antiossidante).

*Lpb. pentosus* O17 ha mostrato una bassa sopravvivenza nel mosto oleoso, di conseguenza ha influenzato in misura minore i campioni di olio d'oliva, al contrario, il lievito *N. wickerhamii* Y18, ha mostrato un alto livello di sopravvivenza nel mosto oleoso e la sua presenza ha influenzato significativamente le proprietà chimiche e sensoriali dell'EVO.

**Parole chiave:** *Lactiplantibacillus*; lieviti; olio extra vergine d'olive; caratterizzazione tecnologica

## **1. Introduzione**

L'olio extra vergine di oliva (EVO) è un prodotto tradizionale dell'area Mediterranea, ottenuto per estrazione meccanica dei frutti dell'olivo (*Olea europaea* L.). La produzione mondiale di olio d'oliva è stata stimata in circa 3 milioni di tonnellate, di cui 2 prodotte nei Paesi Europei (stagione olearia 2021/2022; International Olive Oil Council, IOC; <https://www.internationaloliveoil.org/>). Il profilo microbiologico dell'olio di oliva rispecchia in parte quello di frutti sani e/o integri. Durante il processo di estrazione, il microbiota della carposfera delle olive (influenzato dalla cultivar, area geografica, maturazione dei frutti, tempi di raccolta; Zullo e Ciafardini, 2022) può migrare nell'olio di oliva. Anche i microrganismi provenienti dal frantoio e dal

processo di lavorazione possono contribuire alla composizione del microbiota dell'olio (Zullo e Ciafardini, 2022). Durante la produzione e la conservazione dell'olio, i microrganismi subiscono pressioni selettive (principalmente legate alla presenza di composti fenolici e al basso contenuto di zuccheri; Guerrini et al., 2019; Fancelo et al., 2020; Zullo e Ciafardini, 2020a; 2022), che possono influenzare l'evoluzione del microbiota. I microrganismi sono intrappolati all'interno di microgocce di acqua di vegetazione e la loro sopravvivenza dipende dalle caratteristiche dell'olio. I lieviti possono sopravvivere in misura maggiore nell'olio di oliva, mentre i batteri soffrono maggiormente l'effetto tossico dei composti fenolici e diminuiscono rapidamente durante il periodo di conservazione. Le muffe (*Aspergillus* spp.) possono trovarsi in oli di scarsa qualità ottenuti da frutti danneggiati (Zullo e Ciafardini, 2022).

I lieviti associati all'olio d'oliva sono caratterizzati da un'elevata diversità (Zullo e Ciafardini, 2022). Membri delle specie *Candida oleophila*, *C. diddensiae*, *C. norvegica*, *C. parapsilosis*, *C. adriatica*, *C. temnochilae*, *C. dendronema*, *C. boidinii*, *Nakazawaea molendinoi*, *N. wickerhamii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kuraishia capsulate* e *Yamadazyma terventina* (Guerrini et al., 2019; Mari et al., 2016; Zullo and Ciafardini, 2020b; Zullo et al., 2021) sono stati frequentemente isolati da oli d'oliva freschi e ben conservati. Altre specie come *Ogataea histriana*, *O. kolombanensis* and *Kuraishia mediterranea*, sono stati isolati sporadicamente nelle diverse fasi del processo di estrazione (es. paste molite e gramolate, acque di vegetazione, sedimenti oleosi ed oli esausti; Zullo e Ciafardini, 2022). I microrganismi, e in particolare i lieviti, possono influenzare positivamente o negativamente le caratteristiche chimico-fisiche e sensoriali dell'EVO, in base alla presenza di specifiche attività enzimatiche (Zullo e Ciafardini, 2020b, 2022). Per esempio le  $\beta$ -glucosidasi ed esterasi sono, rispettivamente, coinvolte nella degradazione dell'oleuropeina e del suo aglicone derivato, contribuendo alla riduzione del sapore amaro nell'EVO e all'aumento delle sue caratteristiche antiossidanti (dovute alla produzione di idrossitirosolo; Ciafardini and Zullo, 2002). Al contrario, la presenza di fenolossidasi, perossidasi (coinvolti nell'ossidazione dei fenoli polari) e lipasi (idrolisi dei trigliceridi e rilascio di acidi grassi liberi) può diminuire la qualità dell'EVO a causa di fenomeni di irrancidimento ossidativo e idrolitico. Le pectinasi sono coinvolte nel metabolismo delle pectine con produzione di metanolo ed etanolo che possono reagire con gli acidi grassi liberi per formare metil- ed etil-esterasi (indicatori di qualità, abbondanti in oli d'oliva ottenuti da frutti danneggiati).

Il profilo dei composti organici volatili dell'olio di oliva è influenzato anche dal metabolismo microbico. Batteri e lieviti possono produrre attributi positivi (es. fruttato, amaro, piccante) o generare note indesiderate (es. muffa, muffa, vinoso-aceto; Zullo e Ciafardini, 2022). Pertanto, lo studio delle proprietà enzimatiche dei lieviti e dei batteri associati all'olio di oliva può essere cruciale per ottenere un prodotto di alta qualità.

In questo studio, diversi ceppi di batteri lattici e lieviti sono stati testati per diverse attività enzimatiche, performance di crescita e tolleranza allo stress, al fine di selezionare ceppi appropriati da utilizzare come inoculo nel mosto oleoso e ottenere un olio extravergine di oliva (EVO) con proprietà fisico-chimiche, organolettiche e nutrizionali migliorate.

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1. Identificazione e caratterizzazione dei ceppi di *Lactiplantibacillus*

Settantasette ceppi (**Tabella 1**) di *Lactiplantibacillus paraplantarum* (n. 4), *Lpb. plantarum* (n. 50) e *Lpb. pentosus* (n. 23) sono stati testati per diverse attività enzimatiche e capacità di crescita, come descritto da Zotta et al. (2022).

**Tabella 1.** Lista dei ceppi appartenenti al genere *Lactiplantibacillus*, utilizzati in questo studio.

Origine	Fonte	Ceppi e specie
Formaggio (CH)	Caciocavallo	<i>Lpb. paraplantarum</i> F10, B7N26; <i>Lpb. plantarum</i> B7N23; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B15, C17, S12
	Formaggio	<i>Lpb. plantarum</i> ISLCPT68; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> FSL170; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ISLCPT57, FSM17
Prodotti carnei (M)	Salami	<i>Lpb. pentosus</i> LPL
Prodotti Vegetali (P)	Vegetali	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> S85, LM3
	Insilati	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DCU101, NCFB340
Olive (O)	Salamoia	<i>Lpb. pentosus</i> 2TP, 4TP, 4TG, 5TP, P13.3; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> P1.5
	Olive da tavola trattate ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O5; <i>Lpb. plantarum</i> : O1, O4
	Olive da tavola naturali ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O11, O12, O15; <i>Lpb. plantarum</i> O13
	Salamoia da olive da tavola trattate ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O17, O18, O19, O20
	Salamoia da olive naturali ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O24
	Olive da tavola ( <i>Nocellara del Belice</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> OM24, OM53, OM52, OM62, OM50, OM13, OM14, OM35
Impasti acidi (SD)	Manioca	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DKO22, 38AA
	Tapioca	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> DK36
	Miglio fermentato	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> CNRZ1890
	Ogi	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> NCIMB12120
	Pane di Altamura	<i>Lpb. plantarum</i> PA20S, PE2S
	Pane Carasau	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 1069, 872

	Pane Cornetto di Matera	<i>Lpb. paraplantarum</i> MTG8L, MTG30L; <i>Lpb. plantarum</i> MT2A11S, MT2D3S; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> MTC13L; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> : MTD12L, MT2D20S, MTNTA3S, MT2D6S, MT2D7S, MT2D25L, MT2S, MTF13S, MTF1L, MTF28L, MTF9L
	Pane Moddizzosu	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 954
	Pane Spianata	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 1089
	Pane Zichi	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 1505, 1513
Vino (W)	Vino	<i>Lpb. plantarum</i> B161
		<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> UT2.1, US3.1, UBS3
Uomo (H)	Uomo	<i>Lpb. plantarum</i> WCFS1
	Saliva	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NCIMB8826
Fonte sconosciuta (U)	Fonte sconosciuta	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> S2A19LPa

**Fermentazione dello xilosio:** i ceppi sono stati strisciati su MRS base addizionato di 10 g/L D-xilosio e 0,16 g/L bromocresol porpora (BPC) come indicatore di pH e incubati a 30°C per 48 ore in anaerobiosi.

Il viraggio del colore del substrato dal porpora al giallo e la presenza di colonie gialle indicavano la capacità di utilizzare lo xilosio.

**Tolleranza ad alte concentrazioni NaCl:** i ceppi sono stati inoculati (10% v/v) in WMB supplementato con 7,5% p/v o 10% p/v NaCl e 0,16 g/L BCP. Dopo incubazione (30°C, 48 ore, anaerobiosi) il viraggio di colore dal viola al giallo indicava la presenza di sopravvissuti.

**Produzione di esopolisaccaridi (EPS):** i ceppi sono stati inoculati su MRS base addizionato di 20 g/L di maltosio (M-MRS), o 20 g/L di glucosio (G-MRS), o 50 g/L saccarosio (S-MRS) come fonte di carbonio. Al termine dell'incubazione (30°C, 48 ore, anaerobiosi), i ceppi in grado di produrre colonie filanti o mucose sono stati considerati produttori di EPS.

**Produzione di acido- $\gamma$ -amino butirrico (GABA):** i ceppi sono stati inoculati (1% v/v) in WMB e in WMB+1% (p/v) sodio glutammato (WMB-Glu). Al termine dell'incubazione (30°C, 48 ore, anaerobiosi), l'accumulo di GABA è stato valutato qualitativamente mediante Thin Layer Chromatography (TLC).

**Attività antimicrobica:** la capacità inibitoria è stata testata utilizzando il metodo del Deferred Antagonism Assay, utilizzando *Debaryomyces hansenii* DH-02, *Yarrowia lipolytica*, *Listeria innocua* BL86/26 and *Lpb. plantarum* C17, come ceppi indicatori. Al termine dell'incubazione (48 ore, 30°C) il diametro delle zone di inibizione attorno agli spot è stato misurato utilizzando un calibro.

**Attività della catalasi:** l'attività della catalasi è stata rilevata qualitativamente attraverso la formazione di bolle, in presenza di una soluzione di perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3%.

**Sopravvivenza ai composti fenolici:** i ceppi sono stati inoculati (10% v/v; piastre microtiter da 96 pozzetti) in mWMB supplementato con acido gallico (diluizione da 100 to 6.25 mM), acido protocatecuico (da 50 a 3.12 mM), acido 4-idrossibenzoico (da 40 a 2.5 mM) e acido siringico (da 25 a 1.56 mM). Dopo incubazione (30°C, 24 ore), il substrato torbido (metodo semi-quantitativo) indicava la presenza di sopravvissuti ad una data concentrazione di composti fenolici.

**Idrolisi dell'oleuropeina e produzione di idrossitiroso:** i ceppi sono stati inoculati (10% v/v) in piastre da 96 pozzetti contenenti MRS pH 7,4 (senza estratto di carne) supplementato con 1 g/L di oleuropeina. Al termine dell'incubazione (7 giorni, 30°C, anaerobiosi), i surnatanti sono stati raccolti (12000 xg, 5 min, 4°C) e l'oleuropeina degradata e l'idrossitiroso formato sono stati valutati qualitativamente attraverso un saggio TLC.

**Sopravvivenza alle acque di vegetazione:** 15 ceppi (*Lpb. pentosus* OM13, OM14, OM24, OM50, OM53, OM52, OM62, 2TP, O17, O18; *Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* C17, ISLCPT57, MT2A11S, WCFS1; *Lpb. plantarum* subsp. *argentoratensis* MTC13L) sono stati utilizzati per testare la loro sopravvivenza nelle acque di vegetazione (AV) ottenute dalla produzione di olio d'oliva delle cultivar *Leccino*, *Coratina* (frantoio situato a Tricarico, regione Basilicata, Italia) e *Cima di Melfi* (frantoio situato a Grottaglie, regione Puglia, Italia). I ceppi sono stati inoculati (con una popolazione finale di 10<sup>7</sup> ufc/mL) in diverse concentrazioni (diluizione dal 50% al 0% v/v; piastre da 96 pozzetti) di AV per 15 min at 30°C. Al termine dell'incubazione le cellule trattate nelle AV sono state inoculate (10% v/v) in WMB broth pH 6,8 per valutare la presenza di sopravvissuti dopo 24 ore di incubazione a 30°C (substrato torbido; saggio semi-quantitativo). I ceppi con la maggiore resistenza (*Lpb. pentosus* OM24 and O17, *Lpb. plantarum* C17 and MT2A11S) sono stati ulteriormente studiati per la loro tolleranza alle AV (da 50% a 0% v/v) utilizzando tempi di incubazione più lunghi (15, 30, 60 e 120 min, at 30°C). I sopravvissuti sono stati valutati come descritto in precedenza. Per ogni saggio sono state eseguite due repliche biologiche.

### **2.1.1. Contenuto fenolico totale e profilo fenolico delle AV**

I surnatanti delle AV (3000 xg, 15 min, 4°C) di *Leccino*, *Coratina* and *Cima di Melfi* cv. sono stati filtrati (Millex® filter 0.22 µm, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) e utilizzati per la determinazione del contenuto fenolico totale (TPC; saggio Folin-Ciocalteu) e l'analisi del profilo fenolico è stata eseguita utilizzando un approccio HPLC-DAD (Zotta et al., 2022).

## **2.2. Identificazione e caratterizzazione dei ceppi di lievito**

### **2.2.1. Isolamento e identificazione dei lieviti**

I lieviti sono stati isolati da paste di olive gramolate e molite, mosto oleoso e acque di vegetazione (AV) raccolti durante la produzione dell'olio d'oliva delle cultivar di *Leccino*, *Coratina*, *Cima di Melfi*, *Frantoio*, *Ogliarola* (**Tabella 2**), in diversi frantoi delle regioni Puglia e Basilicata (Sud Italia), sono stati identificati a livello di specie attraverso l'amplificazione e il sequenziamento (servizio esterno, Genechron Srl, Roma, Italia) della regione ITS e sono stati caratterizzati

genotipicamente e de-duplicati usando le tecniche RAPD-PCR (primers M13) e microsatellite-primed PCR (MSP-PCR, oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub>), come descritto da Giavalisco et al. (2023).

**Tabella 2. Lista di ceppi di lieviti utilizzati in questo studio.**

Fonte	Cultivar	Specie e ceppo
Pasta di olive molita	<i>Cima di Melfi</i> <sup>a</sup>	<i>Schwanniomyces polymorphus</i> Y1; <i>Nakazawaea molendinolei</i> Y2, Y4; <i>Candida boidinii</i> Y5, Y6; <i>Lachancea fermentati</i> Y3
	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y7, Y8
Pasta di olive gramolata	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y10; <i>N. wickerhamii</i> Y18
Mosto oleoso	<i>Frantoio</i> <sup>c</sup>	<i>L. fermentati</i> Y12; <i>N. molendinolei</i> Y13
	<i>Ogliarola</i> <sup>c</sup>	
	<i>Coratina</i> <sup>b</sup>	<i>N. wickerhamii</i> Y21
	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>L. fermentati</i> Y22
Acqua di vegetazione	<i>Coratina</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y25; <i>L. fermentati</i> Y26
	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y28

<sup>a</sup>Grottaglie, regione Puglia; <sup>b</sup>Tricarico, regione Basilicata; <sup>c</sup>Venosa, regione Basilicata.

### 2.2.2. Capacità di crescita e attività enzimatiche dei ceppi di lievito

Diciassette ceppi di lievito sono stati identificati a livello di specie, ovvero *Candida boidinii* (2), *Lachancea fermentati* (4), *Nakazawaea molendinolei* (8), *N. wickerhamii* (2) and *Schwanniomyces polymorphus* (1), e sono stati selezionati per le seguenti attività, come descritto da Giavalisco et al. (2023):

**Crescita a basse temperature:** i ceppi sono stati coltivati in MYPG pH 7, a 28 (controllo), 20, 15 e 10°C, fino a 7 giorni. A intervalli di tempo (1, 3, 5, 7 giorni di incubazione), sono stati misurati i valori di assorbanza A<sub>600</sub>. Tutte le prove sono state effettuate in doppio.

**Attività proteasica:** I ceppi sono stati caricati (10 µL) su MYPG agar (MYPGA) contenente 20 g/L di caseina. Al termine dell'incubazione (28°C, fino 7 giorni) un alone chiaro attorno alle colonie indicava attività proteasica.

**Attività β-glucosidasica:** I ceppi sono stati caricati (10 µL) su un terreno contenente 1 g/L di estratto di lievito, 1 g/L di peptone, 2 g/L di glucosio, 0.01 g/L di citrato ferrico ammonico e 0.3 g/L di esculina. Al termine dell'incubazione (28°C, 48 h), un alone scuro intorno alla colonia indicava l'attività β-glucosidasica.

**Attività lipolitica:** I ceppi sono stati caricati (10 µL) su un terreno Tributirina agar contenente 1% (p/v) di tributirina; al termine dell'incubazione (28°C, fino a 7 giorni) un alone chiaro attorno alla colonia indicava un'attività lipolitica.

**Attività esterasica:** I ceppi sono stati caricati (10 µL) su un terreno Tween Agar, contenente 10 g/L di peptone, 5 g/l di NaCl, 0.1 g/L di CaCl<sub>2</sub>, 5 g/L di Tween 80 (aggiunto dopo la sterilizzazione) e 15

g/L di agar. Al termine dell'incubazione (28°C, fino a 10 giorni) un alone chiaro attorno alle colonie indicava un'attività esterasica.

**Attività perossidasi:** l'attività della perossidasi è stata rilevata qualitativamente (formazione di bolle) mediante aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% v/v) su colonie in MYPG (28°C, 48 h).

**Idrolisi dell'oleuropeina e formazione dell'idrossitirosolo:** quest'attività è stata valutata come descritto per i ceppi di *Lactiplantibacillus* (vedi sezione 2.1.), usando come terreno di coltura e T°C, rispettivamente, MYPG e 28°C.

**Sopravvivenza in acqua di vegetazione:** la sopravvivenza dei lieviti in matrici fenoliche complesse è stata valutata utilizzando diverse concentrazioni di AV, come descritto per i ceppi di *Lactiplantibacillus* (vedi sezione 2.1.).

**Attività di riduzione dei radicali:** la capacità di rimuovere il radicale 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) è stata misurata come descritto Ciardini and Zullo (2020), mentre la capacità di ridurre radicali idrossilici è stata effettuata come descritto by Wang et al. (2009).

**Formazione di biofilm:** quest'attività è stata valutata mediante il saggio del cristal violetto come descritto da Camiolo et al. (2017).

### 2.2.3. Sopravvivenza dei lieviti nell'olio extravergine di oliva

I lieviti sono stati inoculati singolarmente (popolazione finale di 10<sup>6</sup> ufc/mL) in due oli extra vergine di oliva ottenuti dalle cultivar di *Leccino* e *Coratina*. Campioni di EVO non inoculati (U-EVO) sono stati utilizzati come controllo. Tutti i campioni sono stati incubati al buio, per 6 mesi a 20°C e, a intervalli di 1 mese, è stata valutata la vitalità dei lieviti. Nello specifico, i campioni di olio sono stati diluiti attraverso diluizioni decimali seriali (1:10) in una soluzione salina e ogni diluzione, dopo una vigorosa agitazione su un vortex, è stata piastrata su MYPGA e incubata a 28°C per 3 giorni, per la conta dei lieviti sopravvissuti.

### 2.3. Selezione dei ceppi e inoculo nel mosto oleoso

I ceppi di *Lpb. pentosus* O17 e *N. wickerhamii* Y18 sono stati selezionati e utilizzati come inoculo in mosto oleoso al fine di migliorare le proprietà chimico-fisiche, organolettiche e sensoriali dell'EVO. Nello specifico, i ceppi sono stati selezionati sulla base della loro tolleranza ai composti fenolici (in quanto il mosto oleoso è una matrice ricca di composti fenolici) e per la capacità di idrolizzare l'oleuropeina (il glicoside responsabile del sapore amaro nelle olive) e per la formazione di idrossitirosolo (un composto antiossidante).

*Lpb. pentosus* O17 è stato utilizzato nella campagna olearia del 2020/2021, mentre *N. wickerhamii* Y18 è stato utilizzato nella campagna olearia del 2021/2022 e del 2022/2023. I ceppi sono stati coltivati (*Lpb. pentosus* O17 in WMB pH 6.8, 16 ore, 30°C; *N. wickerhamii* Y18 in MYPG, 24 ore a 28°C) in bioreattore (volume di lavoro-3 L; Applikon) per ottenere colture ad alta densità cellulare (10<sup>10</sup> ufc/mL) da utilizzare come inoculo nel mosto oleoso (popolazione finale di 10<sup>7</sup> ufc/mL e 10<sup>6</sup> ufc/mL, rispettivamente, per O17 e Y18).

I mosti oleosi inoculati (vedi **Figura 9**) sono stati incubati overnight (16 ore) a temperatura ambiente e poi sottoposti a diversi processi di estrazione, come descritto precedentemente. I mosti

non inoculati, e i campioni di olio derivati, sono stati usati come confronto. Al termine dell'incubazione nel mosto oleoso, la sopravvivenza di *Lpb. pentosus* O17 e *N. wicheramii* Y18, così come la presenza di altri gruppi microbici, sono stati valutati mediante conta in piastra su substrati appropriati (mMRS per i LAB; VRBGA per le *Enterobacteriaceae*; Agar gelisato per la conta batterica totale; OGYE per lieviti e muffe).

L'effetto di *Lpb. pentosus* O17 e *N. wicheramii* Y18 sulle caratteristiche dei campioni di olio è stato valutato come descritto precedentemente.

#### 2.4. Analisi statistiche

Tutte le statistiche e i grafici sono stati eseguiti utilizzando Systat 13.0 per Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

### 3. Risultati e discussioni

#### 3.1. Identificazione e caratterizzazione di ceppi di *Lactiplantibacillus*

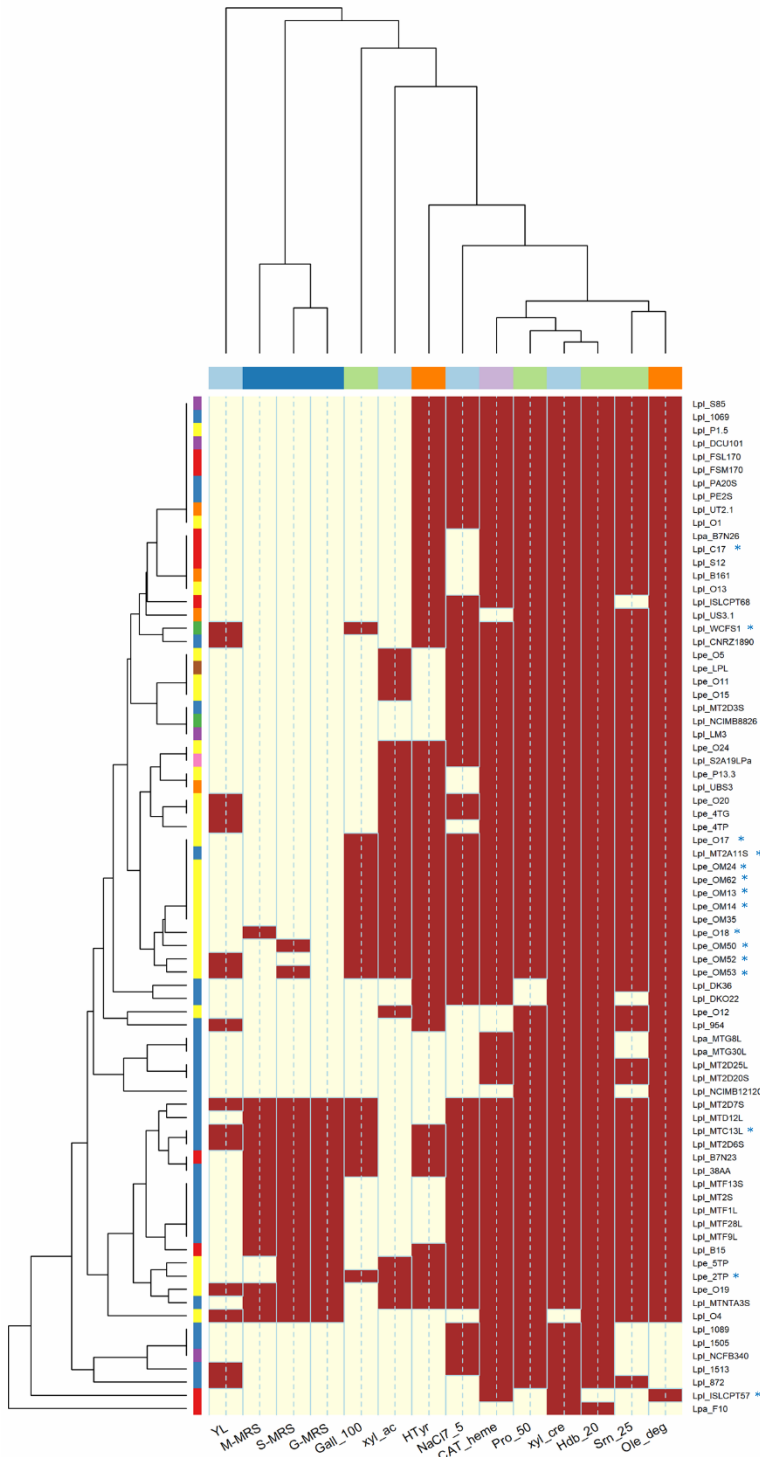
Tutti i ceppi (ad eccezione di *Lpb. plantarum* O4) sono stati in grado di crescere in presenza di xilosio (**Figura 1**), ma solo 27 erano in grado di produrre acido. Nessun ceppo era in grado di crescere in presenza del 10% NaCl, mentre la maggior parte (n. 58) cresceva con il 7.5% di NaCl. Sedici ceppi hanno prodotto EPS sia da glucosio, che maltosio e saccarosio; *Lpb. pentosus* O18 ha formato EPS solo da maltosio, mentre *Lpb. pentosus* O19, OM50 e OM53 solo da saccarosio; nessun ceppo è stato in grado di produrre destrano. I ceppi di *Lactiplantibacillus* selezionati in questo studio non hanno mostrato attività antimicrobica nei confronti di *Lpb. plantarum*, *D. hansenii* e *L. innocua*. Solo 15 ceppi avevano capacità inibitoria contro *Y. lipolytica*.

Nessuno dei ceppi è stato in grado di produrre GABA in presenza di glutammato di sodio, mentre la maggior parte di loro era in grado di sintetizzare l'eme-catalasi, il principale enzima di degradazione del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nei batteri lattici.

Solo 19 ceppi (principalmente *Lpb. pentosus* isolati da olive) erano capaci di crescere in presenza 100 mM acido gallico, mentre la maggior parte cresceva su terreni supplementati con 50 mM acido protocatecuico (n. 73) e con 25 mM di acido siringico (n. 66) (**Figura 1**). L'acido idrossibenzoico presentava la massima tossicità e nessuno dei ceppi è stato in grado di crescere alla concentrazione di 40 mM. Al contrario, bassi livelli di acidi fenolici (gallico ≤ 50 mM, protocatecuico ≤ 25 mM, idrossibenzoico ≤ 20 mM, siringico ≤ 12.5 mM) non hanno inibito la crescita dei ceppi. L'analisi della minima concentrazione inibente (MIC; **Figura 2**) ha permesso di identificare i lattobacilli più tolleranti (isolato da olive e impasti acidi; cluster C3), caratterizzati dalla maggiore resistenza all'acido gallico (100 mM).

In questo studio la capacità di degradare l'oleuropeina era diffusa tra i ceppi di *Lactiplantibacillus* (n. 71; attività β-glucosidasi), mentre la capacità di produrre idrossitirosolo (attività esterasica) è stata trovata solo in 50 lattobacilli (**Figura 1**). La capacità di formare idrossitirosolo è una caratteristica desiderata tra i ceppi di *Lactiplantibacillus*, in quanto può migliorare le proprietà antiossidanti dei prodotti derivati dalle olive, apportando benefici per la salute umana; l'idrossitirosolo, infatti, è uno dei più potenti scavenger di radicali liberi, ed esercita

potenziali effetti cardioprotettivi, antitumorali, regolatori endocrini, antimicrobici (prove *in-vitro* and *in-vivo*). A tal proposito, l'EFSA ha indicato che il consumo di olio d'oliva contenente idrossitirosolo o tirosolo, nonché loro derivati (assunzione giornaliera di 5 mg Hyt/20 g in olio di oliva), contribuisce a proteggere i lipidi nel sangue dallo stress ossidativo (Regolamento della Commissione EU n.432/2012).



**Figura 1. Correlazione tra le proprietà tecnologiche dei ceppi di *Lactiplantibacillus*. Box rosso: positivo; box giallo: negativo. Codice del dendrogramma delle colonne: YL, attività antimicrobica contro *Yarrowia lipolytica*; M-MRS, S-MRS, G-MRS produzione di esopolisaccaridi su maltosio, saccarosio e glucosio, rispettivamente; Gall\_100 (100 mM acido gallico), Pro\_50 (50 mM acido protocatecuico), Hdb\_20 (20 mM**

4-acido idrossibenzoico) and Srn\_25 (25 mM acido sirringico) riferito alla tolleranza ai composti fenolici; xyl\_cre, crescita su xylose; xyl\_ac, produzione di acido da xylosio; NaCl7\_5, tolleranza al sale; CAT\_heme, attività catalasica, Ole\_deg, idrolisi dell'oleuropeina, Htyr, formazione di idrossitiroso. Dendrogramma delle righe (relazioni di somiglianza tra i ceppi): specie LAB: *Lpl*, *Lpb. plantarum*, *Lpa*, *Lpb. paraplantarum*, *Lpe*, *Lpb. pentosus*; fonte di isolamento: vegetali (viola), impasti acidi (blu), olive e prodotti derivati (giallo), prodotti lattiero-caseari (rosso), vino (arancio), fonti umane (verde), prodotti carnei (marrone), fonti sconosciute (rosa) (da Zotta et al., 2022).

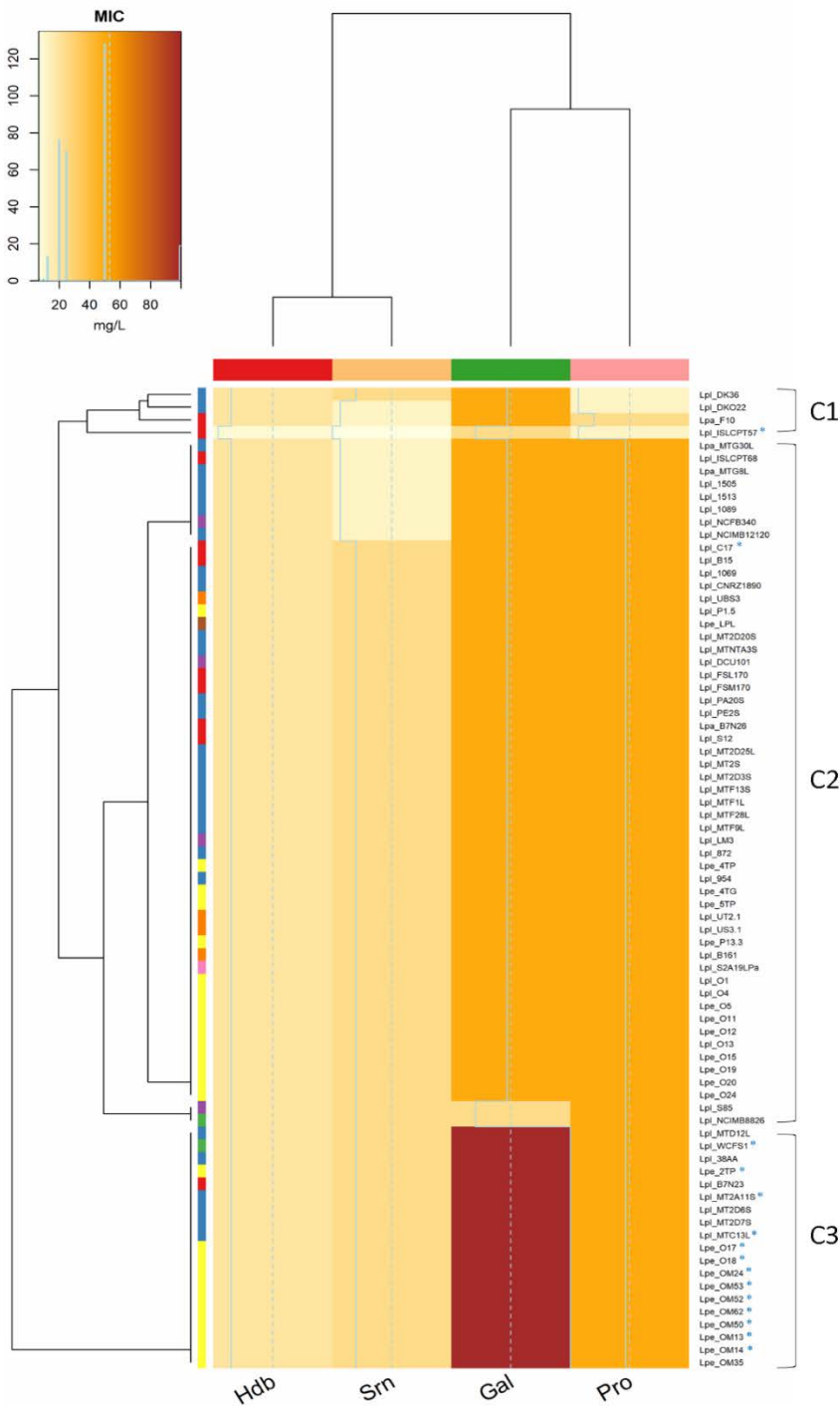


Figure 2. Concentrazione inibitoria minima (MIC, mg/L) dell'acido 4- idrossibenzoico (Hdb, 40-2.5 mM), sirringico (Srn, 25-1.56 mM), gallico (Gal, 100-6.25 mM) e protocatecuico (Pro, 50-3.12 mM). La concentrazione dei composti fenolici è definita dalle diverse gradazioni di colore, dal giallo (0 mg/L) al

rosso (100 mg/L). Dendrogramma delle righe: specie LAB: *Lpl*, *Lpb. plantarum*, *Lpa*, *Lpb. paraplantarum*, *Lpe*, *Lpb. pentosus*; fonte di isolamento: vegetali (viola), impasti acidi (blu), olive e prodotti derivati (giallo), prodotti lattiero-caseari (rosso), vino (arancio), fonti umane (verde), prodotti carnei (marrone), fonti sconosciute (rosa). Dendrogramma delle righe mostrano le relazioni di similarità tra i ceppi sulla base della resistenza ai composti fenolici. Dendrogramma delle colonne mostra la somiglianza tra l'effetto dei composti fenolici sui ceppi di *Lactiplantibacillus* (da Zotta et al., 2022).

In questo studio, nessun ceppo è stato in grado di sopravvivere in AV non diluita, mentre la tolleranza ai campioni di AV diluiti (15 min di incubazione) dipendeva dalla cultivar (**Tabella 3**). La *Coratina* ha influito maggiormente sulla sopravvivenza dei ceppi, mentre *Cima di Melfi* ha fornito le condizioni meno stressanti. I ceppi con la maggiore tolleranza erano *Lpb. pentosus* O17 e OM24 (isolati da olive), *Lpb. plantarum* C17 (da formaggio), *Lpb. plantarum* MTDA11S (da impasti acidi).

**Tabella 3. Ceppi sopravvissuti dopo l'esposizione (15 min) a differenti concentrazioni di acque di vegetazione (AV) derivate dalla produzione di olio delle cultivar *Leccino*, *Coratina* e *Cima di Melfi* (da Zotta et al., 2022).**

Ceppi	Specie	Dose che causa $\geq 7$ -log riduzioni <sup>a</sup>		
		AV <sup>b</sup>	AV <sup>b</sup>	AV <sup>b</sup>
		<i>Leccino</i>	<i>Coratina</i>	<i>Cima di Melfi</i>
O17	<i>Lpb. pentosus</i>	50	25	50
O18	<i>Lpb. pentosus</i>	25	12.5	50
OM24	<i>Lpb. pentosus</i>	12.5	12.5	50
OM53	<i>Lpb. pentosus</i>	25	6.25	50
OM52	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	6.25	25
OM62	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	6.25	25
OM50	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	6.25	25
OM13	<i>Lpb. pentosus</i>	12.5	6.25	25
OM14	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	12.5	25
2TP	<i>Lpb. pentosus</i>	12.5	6.25	25
MT2A11S	<i>Lpb. plantarum</i>	25	25	25
WCFS1	<i>Lpb. plantarum</i>	12.5	6.25	25
C17	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	12.5	25	25
ISLCPT57	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	6.25	3.12	12.5
MTC13L	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	12.5	6.25	12.5

<sup>a</sup> La concentrazione di cellule utilizzata per inoculare le diverse percentuali (%) di AV era 7-log ufc/mL. <sup>b</sup> AV è stata diluita con NaCl 0.85% (w/v); la % di AV corrisponde alle seguenti diluizioni (d): AV 50% = 2d; AV 25% = 4d; AV 12.5% = 8d; AV 6.25% = 16d; AV 3.12% = 32d

Il contenuto fenolico totale (CFT) e il profilo fenolico sono stati valutati per tutti i campioni di AV. *Cima di Melfi* aveva il più alto CFT ( $11.9 \pm 0.3$  g/Kg) rispetto alle AV delle cultivar *Coratina* ( $8.8 \pm 0.2$  g/kg) e *Leccino* ( $7.2 \pm 0.3$  g/kg). Il verbascoside, l'isomero  $\beta$ -OH-verbascoside e un derivato dell'oleuropeina erano i principali composti fenolici delle AV (**Figura 7**), sebbene la loro presenza era dipendeva dalla cultivar.

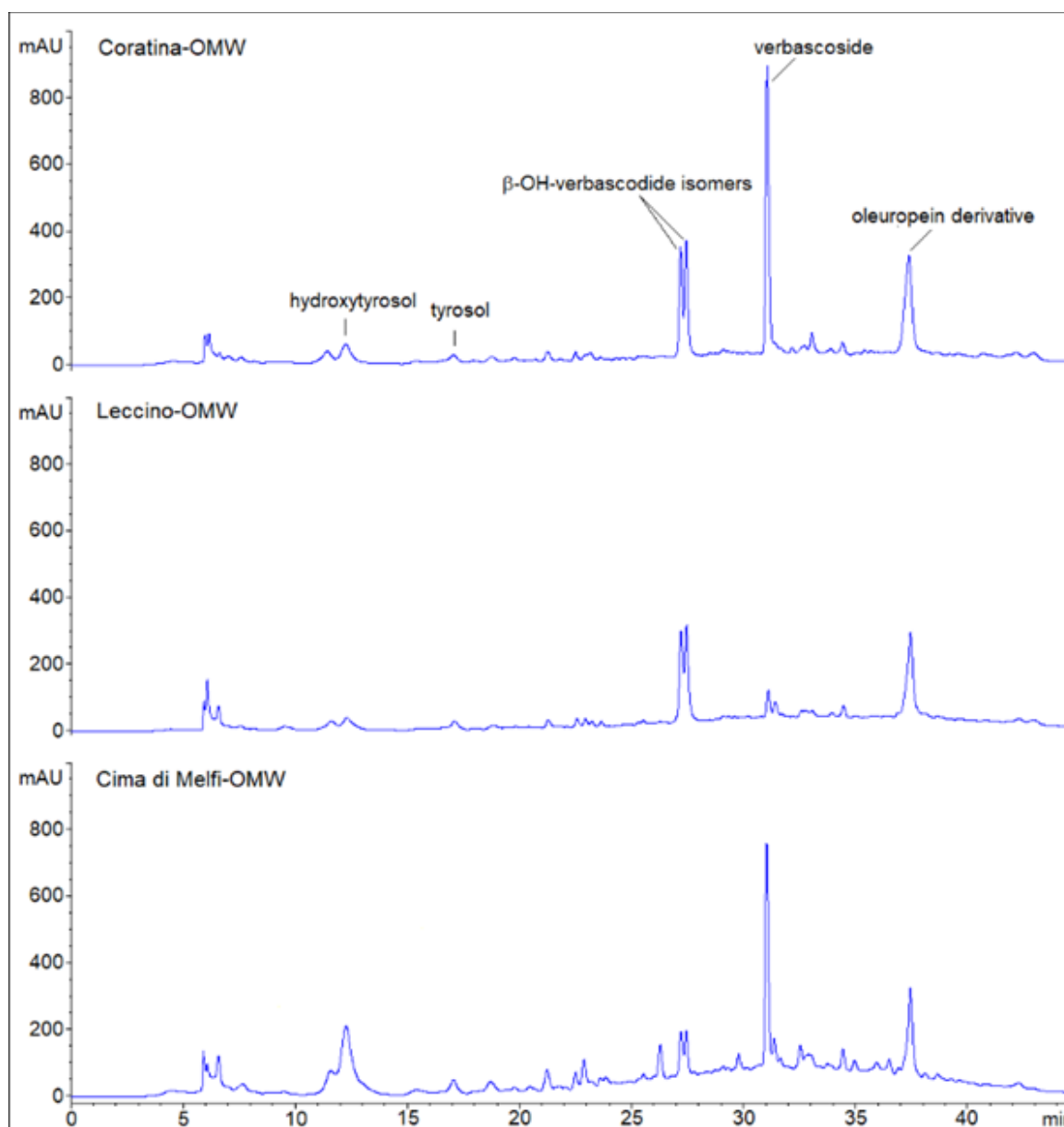
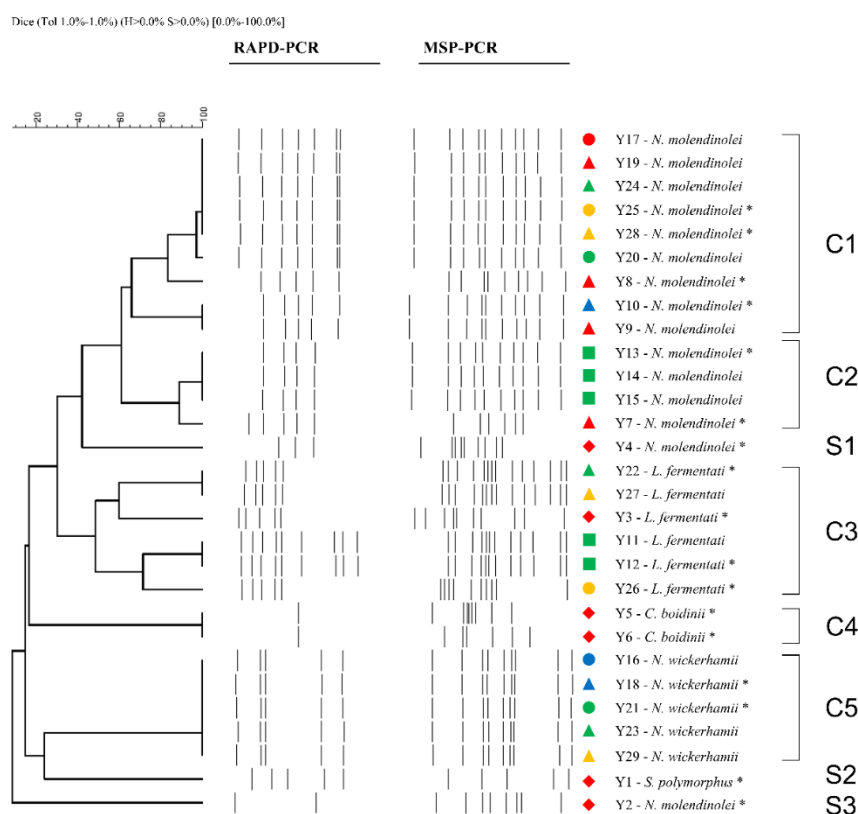


Figura 3. Profilo fenolico (cromatogrammi HPLC) delle acque di vegetazione (AV), derivanti dalla produzione di olio d'oliva delle cultivar *Leccino*, *Coratina* e *Cima di Melfi*. I picchi sono stati assegnati sulla base dei valori del tempo di ritenzione (min), e confrontati con i dati della letteratura e gli spettri UV (280 nm) (da Zotta et al., 2022).

### 3.2. Identificazione e caratterizzazione dei ceppi di lievito

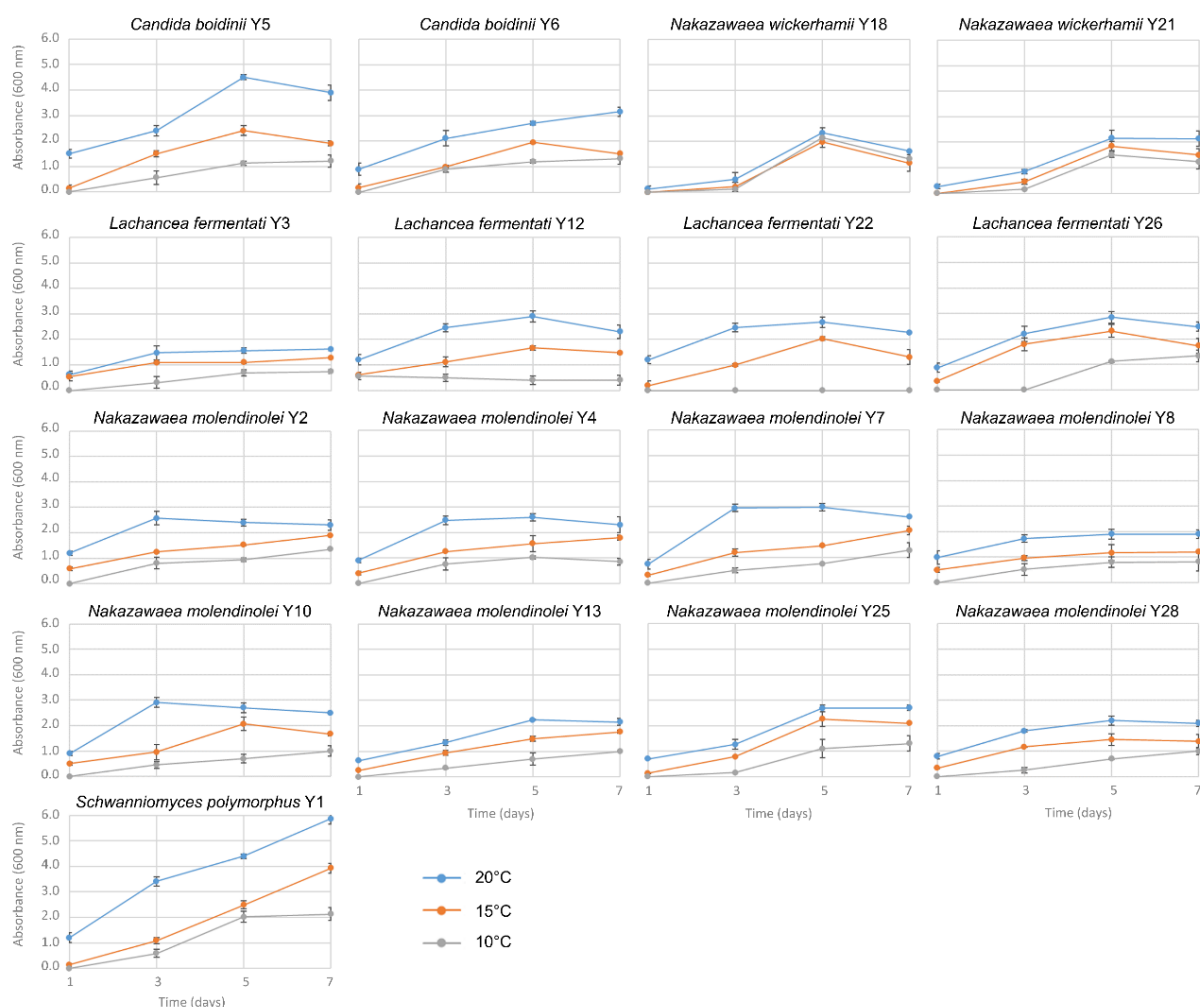
29 isolati di lievito sono stati ottenuti durante la produzione dell'olio di oliva nei frantoi delle regioni Puglia e della Basilicata, de-duplicati utilizzando RAPD-PCR e MSP-PCR e identificati attraverso il sequenziamento della regione ITS. La classificazione ITS indicava che gli isolati appartenevano alle specie *Candida boidinii* (2), *Lachancea fermentati* (6), *Nakazawaea molendinolei* (15), *N. wickerhamii* (5) and *Schwanniomyces polymorphus* (1) (Figura 4).

Un'elevata diversità di specie è stata riscontrata tra i lieviti associati all'olio. La presenza di lieviti nell'olio d'oliva è influenzata da diversi fattori, tra cui l'area geografica, le pratiche agricole, la cultivar di olive, la composizione chimica delle drupe, lo stadio di maturazione dei frutti, i tempi di raccolta e il processo di estrazione (Guerrini et al., 2019; Zullo and Ciafardini, 2020a, 2022). Alcune specie (es., *Nakazawaea molendinolei*, *N. wickerhamii*) sembrano essere legate all'ambiente di produzione (es., attrezzature nei frantoi) piuttosto che al microbiota delle olive, mentre altre come *Schwanniomyces polymorphus* sono contaminanti sporadici derivanti dall'ambiente del frantoio o dalla contaminazione delle olive con il suolo.



**Figura 4. Cluster Analysis delle bande del profilo RAPD-PCR e MSP-PCR dei ceppi di lievito isolati durante la produzione di olio d'oliva nei frantoi delle regioni Puglia e Basilicata. I Cluster sono stati siglati da C1 a C5, mentre le sigle dei ceppi non raggruppati sono state siglate da S1 a S3. I colori indicano la fonte di isolamento: rosso, pasta di olive molita; blu, pasta di olive gramolata; verde, mosto oleoso; giallo, acqua di vegetazione. I simboli indicano le cultivar di olive: triangolo, *Leccino*; cerchio, *Coratina*; diamante, *Cima di Melfi*; quadrato, miscele di cultivar (*Frantoio, Ogliarola*). \* Ceppi selezionati per le prove di caratterizzazione e per la sopravvivenza in EVO (da Gialvalisco et al., 2023).**

L'olio è generalmente conservato a 15-17°C e, pertanto la capacità dei lieviti di crescere a basse temperature è cruciale per la qualità dei prodotti. In questo studio, diversi ceppi sono stati in grado di crescere a 20°C e 15°C; temperature più basse (10°C), invece, hanno compromesso le performance di crescita della maggior parte dei ceppi (Figura 5). *L. fermentati* Y22 era completamente inibito a 10°C.



**Figura 5. Valori di assorbanza dei ceppi di lieviti coltivati per 7 giorni a 20°C (linee blu), 15°C (linee arancioni) e 10°C (linee grigie). Valori di assorbanza sono stati determinati dopo 1, 3, 5 e 7 giorni di incubazione (da Gialisco et al., 2023).**

I lieviti isolati dall'olio sono stati ampiamente studiati per le attività enzimatiche che possono influenzare, positivamente o negativamente, la qualità dell'EVO (Zullo and Ciafardini, 2022). I risultati delle attività enzimatiche testate in questo studio sono stati riportati in **Tabella 4**. Tutti i ceppi avevano attività  $\beta$ -glucosidasi, mentre nessuno mostrava attività lipolitica. L'esterasi era presente solo nei ceppi di *N. wickerhamii*. La capacità di degradare  $H_2O_2$  era diffusa tra i ceppi (ad eccezione di due *Candida boidinii*), mentre l'attività proteasica era ceppo-dipendente. Le olive, e quindi i prodotti derivati, sono considerati matrici ricche di composti fenolici. L'oleuropeina, il glicoside associato al gusto amaro, è sicuramente il principale composto fenolico nelle drupe di olive. La degradazione dell'oleuropeina e la sintesi dell'idrossitirosolo non erano ampiamente distribuite tra i ceppi di lievito, a differenza dei ceppi di *Lactiplantibacillus* (vedi sezione 3.1.). In questo studio, infatti, solo i due ceppi di *N. wickerhamii*, avevano sia attività  $\beta$ -glucosidasi che esterasica, ed erano in grado di idrolizzare l'oleuropeina e formare idrossitirosolo. La tolleranza ai composti fenolici è stata valutata esponendo i lieviti a diverse concentrazioni di AV, utilizzato anche per lo screening dei ceppi di *Lactiplantibacillus*. I ceppi di lievito erano altamente tolleranti alle AV.

**Tabella 4. Attività enzimatiche, idrolisi dell'oleuropeina e formazione dell'idrossitirosolo (da Giavalisco et al., 2023).**

Specie	Ceppi	Attività enzimatiche					Degradazione dell'Oleuropeina	
		$\beta$ -glu <sub>a</sub>	Est <sup>b</sup>	Lip <sup>c</sup>	Perox <sub>d</sub>	Prot <sup>e</sup>	OLE <sup>f</sup>	Htyr <sup>g</sup>
<i>Candida boidinii</i>	Y5	1	0	0	0	1	0	0
	Y6	1	0	0	0	1	0	0
<i>Lachancea fermentati</i>	Y3	1	0	0	1	0	0	0
	Y12	1	0	0	1	1	0	0
	Y22	1	0	0	1	0	0	0
	Y26	1	0	0	1	0	0	0
<i>Nakazawaea molendinolei</i>	Y2	1	0	0	1	1	0	0
	Y4	1	0	0	1	1	0	0
	Y7	1	0	0	1	1	0	0
	Y8	1	0	0	1	0	0	0
	Y10	1	0	0	1	1	0	0
	Y13	1	0	0	1	1	0	0
	Y25	1	0	0	1	1	0	0
Y28	1	0	0	1	0	0	0	
<i>Nakazawaea wickerhamii</i>	Y18	1	1	0	1	0	1	1
	Y21	1	1	0	1	0	1	1
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	Y1	1	0	0	1	0	0	0

<sup>a</sup> Attività  $\beta$ -glucosidasica; <sup>b</sup> Attività esterasica; <sup>c</sup> Attività lipolitica; <sup>d</sup> Attività perossidasi; <sup>e</sup> Attività proteasica; <sup>f</sup> idrolisi dell'oleuropeina ; <sup>g</sup> Formazione dell'idrossitirosolo; 1: presenza, 0: assenza.

I lieviti possono produrre antiossidanti naturali (es. carotenoidi, acido citrico, acido ascorbico, tocoferoli, glutazione,  $\beta$ -glucani associati alla parete cellulare) che possono inibire la degradazione ossidativa dei lipidi (limitando la generazione di perossidi) e migliorare la salute umana. In questo studio, tra i ceppi di lievito è stata riscontrata una bassa variabilità nella capacità di ridurre i radicali DPPH, mentre la capacità di degradare i radicali idrossilici era ceppo-dipendente e variava tra il 66% (*N. molendinolei* Y7) al 28% (*S. polymorphus* Y1; **Figura 6**). *N. wickerhamii* Y18 e Y22 erano gli unici ceppi che mostravano una potenziale capacità nella formazione di biofilm, dopo 24 e 48 ore di incubazione, mentre gli altri ceppi presentavano una scarsa capacità di adesione (**Figura 7**).

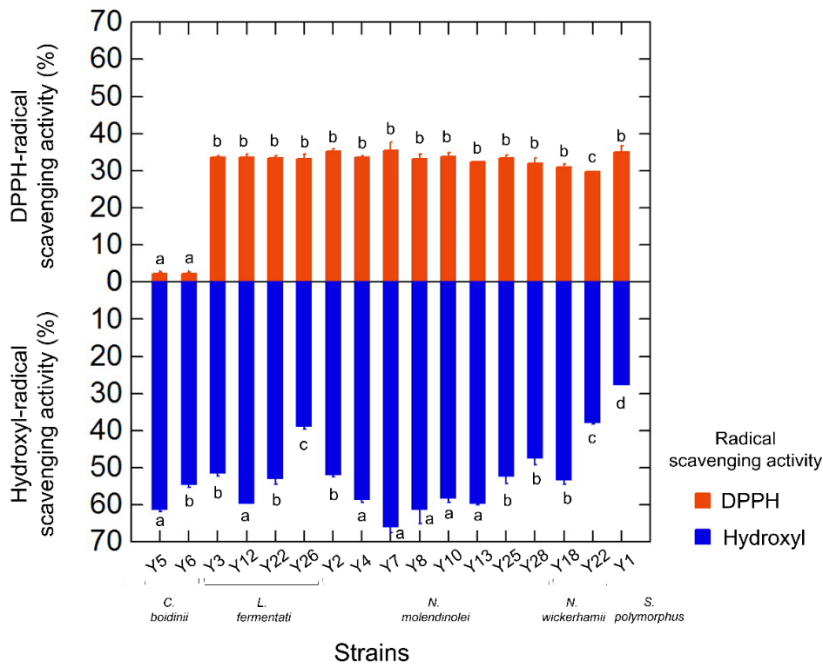


Figura 6. Attività di riduzione dei radicali DPPH e idrossilici da parte dei lieviti. Le lettere sulla barra dei grafici indicano differenze significative (Turkey's HSD,  $p \leq 0.001$ ) nell'attività di scavenging all'interno dei ceppi (da Givalisco et al., 2023).

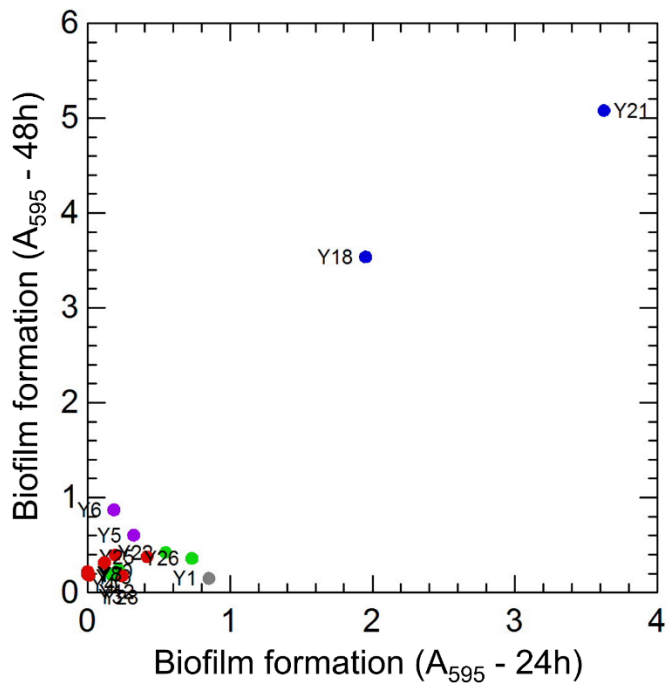
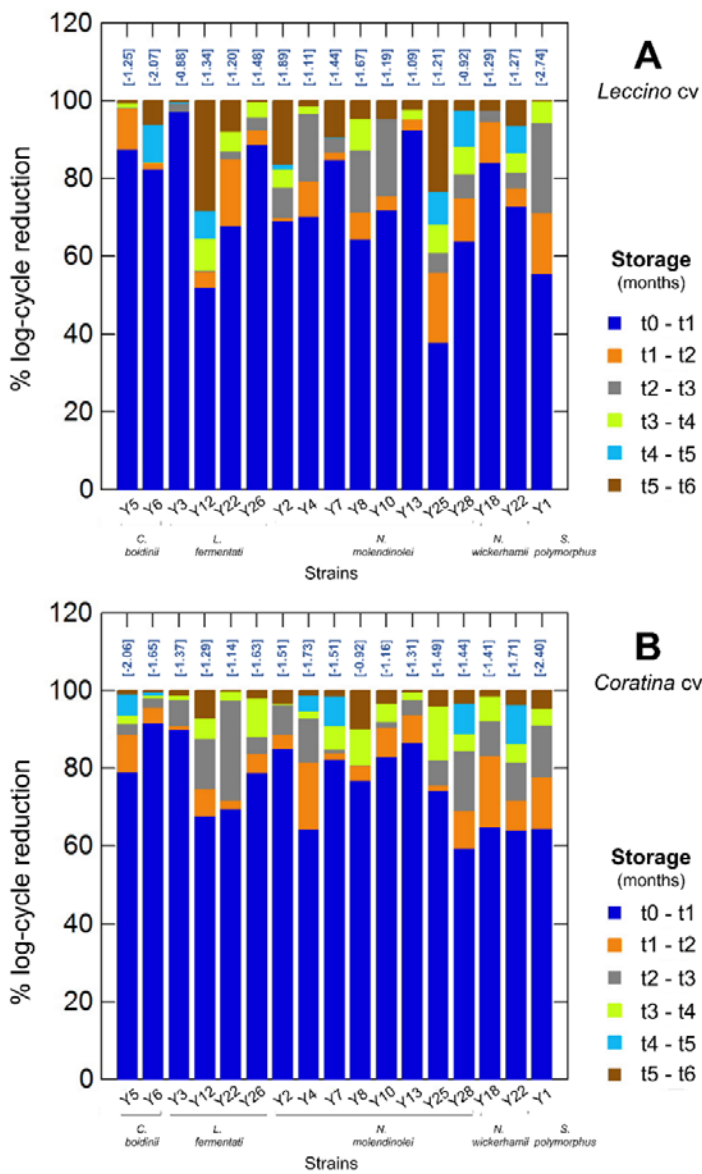


Figura 7. Formazione di biofilm (valori di assorbanza a 595 nm,  $A_{595}$ ) nei ceppi lieviti, dopo 24 ore e 48 ore di incubazione. Colore del simbolo: viola, *Candida boidinii*; verde, *Lachancea fermentati*; rosso, *Nakazawaea molendinolei*; blu, *N. wickerhamii*; grigio, *Schwanniomyces polymorphus* (da Givalisco et al., 2023).

**Sopravvivenza dei lieviti nell'EVO**

Un'elevata capacità di sopravvivenza (in generale la riduzione delle cellule vitali era inferiore a 2 cicli log dopo 6 mesi di incubazione) è stata osservata per tutti i lieviti, sia nei campioni di EVO *Leccino* che *Coratina* (Figura 8). La maggiore riduzione della vitalità cellulare, tuttavia, è stata osservata già dopo il primo mese di conservazione (range t0-t1; barre blu in Figura 8). Durante il periodo di conservazione non è stata osservata crescita microbica (a limiti rilevabili, > 9 ufc/mL) negli oli di controllo non inoculati, confermando che i sopravvissuti corrispondevano ai lieviti inoculati. In coerenza con quanto riportato in letteratura, in questo studio abbiamo confermato che i lieviti sono il gruppo microbico che sopravvive maggiormente nell'olio d'oliva.



**Figure 8.** Lieviti sopravvissuti in EVO di *Leccino* (A) e *Coratina* (B). La sopravvivenza è espressa in percentuale (%) della riduzione di cicli-log nei 6 mesi di conservazione. Per ogni ceppo, la sopravvivenza è stata calcolata mensilmente (range di incubazione t0-t1, t1-t2, t2-t3, t3-t4, t4-t5, t5-t6) come riduzione di log (N/N<sub>0</sub>), dove N<sub>0</sub> e N sono il numero di cellule prima e dopo l'incubazione per ogni mese di conservazione. Il numero tra parentesi, sopra le barre, indica la riduzione complessiva del ciclo logaritmico dopo 6 mesi di conservazione (da Givalisco et al., 2023).

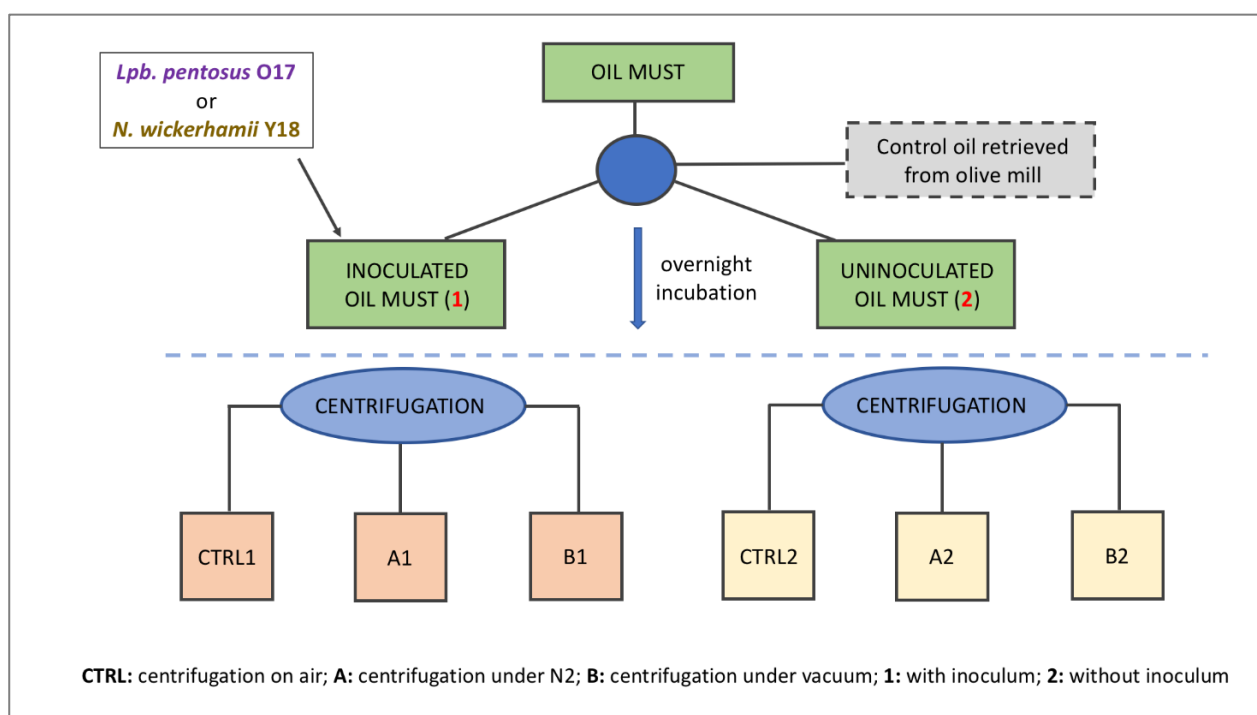
### 3.3. Selezione dei ceppi e inoculo nel mosto oleoso

I ceppi *Lpb. pentosus* O17 e *N. wickerhamii* Y18 sono stati utilizzati per inoculare i mosti oleosi al fine di migliorare le proprietà chimico-fisiche, organolettiche e sensoriali dell'olio EVO.

*Lpb. pentosus* O17 è stato usato come inoculo nel mosto oleoso (*Leccino* and *Coratina* cv; frantoio situato a Tricarico, MT, Sud Italia) ottenuto nella campagna olearia 2020/2021. Il disegno sperimentale per la produzione di oli innovativi, ottenuti con o senza l'inoculo microbico, è stato schematicamente riportato in **Figura 9** e descritto precedentemente.

*Lpb. pentosus* O17 aveva una bassa sopravvivenza nel mosto oleoso, come mostrato in **Figura 10**, e quindi, per le prove successive (anni 2021/2022, 2022/2023; mosto oleoso da *Coratina* cv) il lievito *N. wickerhamii* Y18 è stato usato come inoculo, per la sua elevata tolleranza ai composti fenolici. I nostri risultati, infatti, hanno dimostrato che *N. wickerhamii* Y18 è stato in grado di sopravvivere nel mosto oleoso mantenendo il livello di popolazione iniziale, ovvero della fase di inoculo (**Figura 11**).

Il ceppo *N. wickerhamii* Y18 ha avuto un effetto significativo sulle proprietà dei campioni di EVO, come descritto precedentemente, e potrebbe essere utilizzato per migliorare le caratteristiche chimiche ed organolettiche del prodotto.



**Figura 9: Rappresentazione schematica del disegno sperimentale per la produzione di EVO tradizionale e innovativo. Lo schema riportato è stato utilizzato per la campagna olearia 2020/2021 e 2021/2022; per la campagna olearia 2022/2022 il trattamento sottovuoto è stato scartato dal processo di estrazione.**

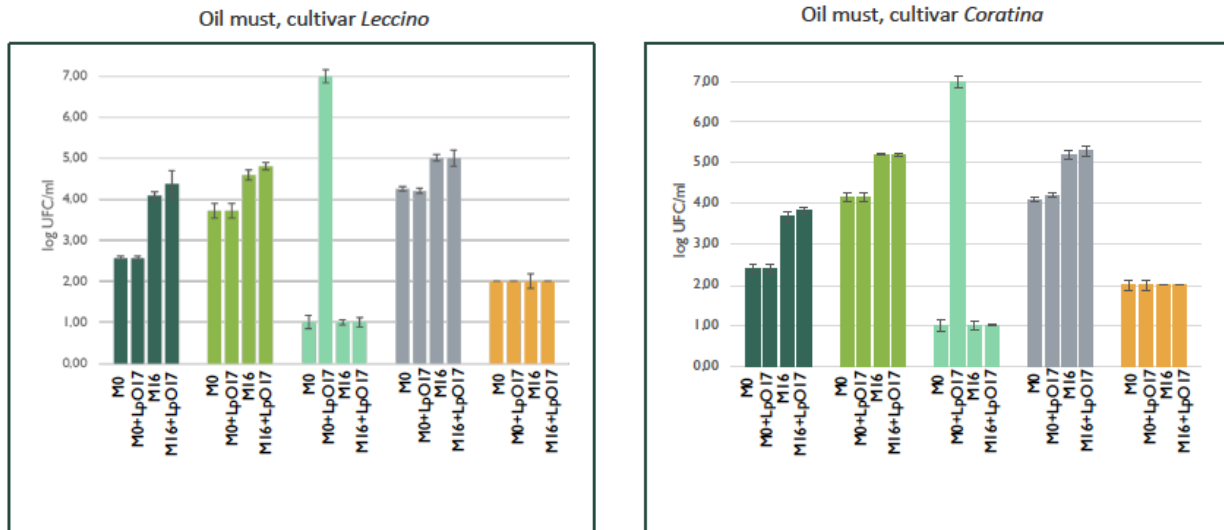


Figura 10: Sopravvivenza di *Lpb. pentosus* O17 nel mosto oleoso ottenuto dalle cultivar *Leccino* e *Coratina*. M0 e M16, rispettivamente, mosto oleoso non inoculato al tempo 0 ore e dopo 16 ore di incubazione. M0+LpO17 e M16+LpO17, rispettivamente, mosto oleoso inoculato al tempo 0 ore e dopo 16 ore di incubazione. Barre verdi: *Enterobacteriaceae*; barre verde chiaro: conta batterica totale; barre celesti: LAB incluso *Lpb. pentosus* O17; barre grigie: lieviti; barre arancioni: muffe.

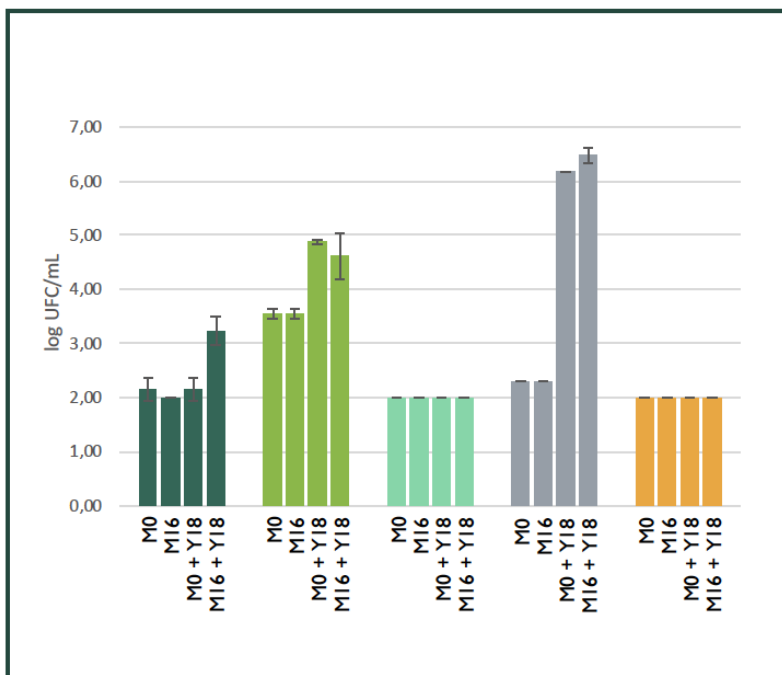


Figura 11: Sopravvivenza di *N. wicheramii* Y18 nel mosto oleoso della cultivar *Coratina*. M0 e M16, rispettivamente, mosto oleoso non inoculato al tempo 0 ore e dopo 16 ore di incubazione. M0+Y18 e M16+Y18, rispettivamente, mosto oleoso inoculato al tempo 0 ore e dopo 16 ore di incubazione. Barre verdi: *Enterobacteriaceae*; barre verde chiaro: conta batterica totale; barre celesti: LAB; barre grigie: lieviti, incluso *N. wicheramii* Y18; barre arancioni: muffe.

## Riferimenti

- [1] Camiolo S., Porru C., Benítez-Cabello A., Rodríguez-Gómez F., Calero-Delgado B., Porceddu A., Budroni M., Mannazzu I., Jiménez-Díaz R., Arroyo-López F.N. 2017. Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards Genomic Science*. 12, 1-14. DOI: 10.1186/s40793-017-0281-z.
- [2] Ciafardini G., Zullo B.A. 2018. Virgin olive oil yeasts: A review. *Food Microbiology*. 70, 245-253. DOI: 10.1016/j.fm.2017.10.010.
- [3] Ciafardini G., Zullo B.A. 2020. In vitro potential antioxidant activity of indigenous yeasts isolated from virgin olive oil. *Journal of Applied Microbiology*. 128, 853-861. DOI: 10.1111/jam.14520.
- [4] Fancello F., Multineddu C., Santona M., Deiana P., Zara G., Mannazzu I., Budroni M., Dettori S., Zara S. 2020. Bacterial biodiversity of extra virgin olive oils and their potential biotechnological exploitation. *Microorganisms*. 8, 97. DOI: 10.3390/microorganisms8010097.
- [5] Giavalisco M., Zotta T., Parente E, Siesto G., Capece A., Ricciardi A. 2023. Effect of oil-born yeasts on the quality of extra-virgin olive oils of Basilicata region. *International Journal of Food Microbiology*. 386, 110041. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110041.
- [6] Guerrini S., Mari E., Barbato D., Granchi L., 2019. Extra virgin olive oil quality as affected by yeast species occurring in the extraction process. *Foods*. 8, 457. DOI: 10.3390/foods8100457.
- [7] Mari E., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. 2016. Enumeration and rapid identification of yeasts during extraction process of extra virgin olive oil in Tuscany. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 32, 93-103. DOI: 10.1007/s11274-016-2049-9.
- [8] Zotta T., Giavalisco M., Parente E., Picariello G., Siano F., Ricciardi A. 2022. Selection of *Lactiplantibacillus* strains for the production of fermented table olives. *Microorganisms*, 10, 625. DOI: 10.3390/microorganisms10030625.
- [9] Zullo B.A., Ciafardini G. 2020a. Virgin olive oil quality is affected by the microbiota that comprise the biotic fraction of the oil. *Microorganisms*. 8, 663. DOI: 10.3390/microorganisms8050663.
- [10] Zullo B.A., Ciafardini G. 2020b. Differential microbial composition of monovarietal and blended extra virgin olive oils determines oil quality during storage. *Microorganisms*. 8, 402. DOI: 10.3390/microorganisms8030402.
- [11] Zullo B.A., Venditti G., Ciafardini G. 2021. Effects of the filtration on the biotic fraction of extra virgin olive oil. *Foods*. 10, 1677. DOI: 10.3390/foods10081677.
- [12] Zullo B.A., Ciafardini G. 2022. Role of yeasts in the qualitative structuring of extra virgin olive oil. *Journal of Applied Microbiology*. 132, 4033-4041. DOI: 10.1111/jam.15478.

---

# Selection and use of microorganisms for the production of extravirgin olive oil with improved nutritional properties

---

*Teresa Zotta\*, Marilisa Giavalisco, Eugenio Parente, Emanuela Lavanga, Annamaria Ricciardi*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

## **Abstract**

The olive oil microbiota partially reflects that of olive fruits and it may positively or negatively affect the physicochemical and sensory features of final product.

In this study, different strains of lactic acid bacteria (belonging to the genus *Lactiplantibacillus*) and yeasts (belonging to different genera and species), which are the dominant member of olive fruits microbiota, were tested for several enzymatic activities, growth performances and stress tolerance, in order to select appropriate strains to be used as inoculum in olive oil must and obtain an extravirgin olive oil (EVOO) with improved physical-chemical, organoleptic and nutritional properties. The screening step allowed to select the strains *Lpb. pentosus* O17 and *N. wickerhamii* Y18, chosen on the basis of their tolerance to phenolic compounds (as the oil must is a phenolic compound-rich matrix) and for the capability to hydrolyse oleuropein (the bitter glycoside of olive fruits) and to form hydroxytyrosol (an antioxidant compound).

*Lpb. pentosus* O17 showed low survival in oil must and, consequently, affected to a lesser extent the olive oil samples; on the contrary, the yeast *N. wickerhamii* Y18 showed high level of survival in oil must and its occurrence significantly affected the chemical and sensory properties of EVOO.

**Keywords:** *Lactiplantibacillus*; yeasts; extravirgin olive oil; technological characterization

## **1. Introduction**

Extra virgin olive oil (EVOO) is a traditional product of Mediterranean area, obtained by mechanical extraction of olive tree fruits (*Olea europaea* L.). World production of olive oil has been estimated at about 3 million tons, 2 of which were produced in European countries (oil season 2021/2022; International Olive Oil Council, IOC; <https://www.internationaloliveoil.org/>).

The microbiological profile of olive oil partially reflects that of healthy and/or undamaged fruits. During the extraction process, the microbiota of olives carposphere (affected by olive cultivars, geographical area, fruit maturation, harvest timing; Zullo and Ciafardini, 2022) can

migrates into olive oil. Microorganisms from oil mill environment and processing may also contribute to the composition of whole oil microbiota (Zullo and Ciafardini, 2022). During oil production and storage, microorganisms undergo selective pressures (mainly related to the presence of phenolic compounds and low sugar content; Guerrini et al., 2019; Fancelo et al., 2020; Zullo and Ciafardini, 2020a; 2022), that may significantly affect the evolution of microbiota. Microorganisms are entrapped in micro-drops of vegetation water and their occurrence depends on capability to survive to oil-related conditions. Yeasts may survive to a greater extent in olive oil, while bacteria suffer more the toxic effect of phenolic compounds and rapidly decrease during storage. Moulds (*Aspergillus* spp.) may be found in low-quality oils extracted from damaged fruits (Zullo and Ciafardini, 2022).

High diversity was found among olive oil-associated yeasts (Zullo and Ciafardini, 2022). Members of *Candida oleophila*, *C. diddensiae*, *C. norvegica*, *C. parapsilosis*, *C. adriatica*, *C. temnochilae*, *C. dendronema*, *C. boidinii*, *Nakazawaea molendinolei*, *N. wickerhamii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kuraishia capsulate* and *Yamadazyma terventina* (Guerrini et al., 2019; Mari et al., 2016; Zullo and Ciafardini, 2020b; Zullo et al., 2021) were frequently isolated from fresh and stored olive oils. Other species, such as the spoilers *Ogataea histrianica*, *O. kolombanensis* and *Kuraishia mediterranea*, sporadically occurred in the different steps of extraction process (i.e., milled and kneaded pastes, pomaces, olive mill wastewater, oil sediments and spoiled oils; Zullo and Ciafardini, 2022).

Microorganisms, and specifically yeasts, may positively or negatively affect the physicochemical and sensory features of EVOO, based on the presence of specific enzymatic activities (Zullo and Ciafardini, 2020b, 2022).  $\beta$ -glucosidases and esterases, for example, are respectively involved in the degradation of oleuropein and its derivative aglycone, contributing to the reduction of bitter taste of EVOO and to the increase of its antioxidant (due to hydroxytyrosol production) features (Ciafardini and Zullo, 2002). On the contrary, occurrence of phenoloxidases, peroxidases (involved in enzymatic oxidation of polar phenols) and lipases (hydrolysis of triglycerides and release of free fatty acids) may decrease the quality of EVOO because of oxidative and hydrolytic rancidity phenomena. Pectinases lead pectin metabolism with production of methanol and ethanol that can react with free fatty acids (FAA) to form methyl and ethyl FAA esters (quality indicators, abundant in olive oils obtained from degraded fruits).

The volatile organic profile of olive oil is also affected by microbial metabolisms. Bacteria and yeasts can produce positive attributes (e.g., fruitiness, bitterness, pungency) or generate undesired notes (e.g., fusty, musty, winey-vinegary; Zullo and Ciafardini, 2022). Therefore, the study of enzymatic properties of olive oil-associated yeasts and bacteria may be crucial to obtain a high-quality product.

In this study, different strains of lactic acid bacteria and yeasts, which are the dominant member of olive fruits microbiota, were tested for several enzymatic activities, growth performances and stress tolerance, in order to select appropriate strains to be used as inoculum in olive oil must and obtain an extravirgin olive oil with improved physical-chemical and nutritional properties.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Identification and characterisation of *Lactiplantibacillus* strains

Seventy-seven strains (**Table 1**) of *Lactiplantibacillus paraplantarum* (n. 4), *Lpb. plantarum* (n. 50) and *Lpb. pentosus* (n. 23) were tested for several enzymatic activity and growth abilities, as described in Zotta et al. (2022).

**Table 1.** List of *Lactiplantibacillus* strains used in this study.

Source group	Source	Strains and species
Cheese (CH)	Caciocavallo cheese	<i>Lpb. paraplantarum</i> F10, B7N26; <i>Lpb. plantarum</i> B7N23; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B15, C17, S12
	Cheese	<i>Lpb. plantarum</i> ISLCPT68; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> FSL170; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ISLCPT57, FSM17
Meat product (M)	Salami	<i>Lpb. pentosus</i> LPL
Plant Material (P)	Vegetables	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> S85, LM3
	Silage	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DCU101, NCFB340
Olives (O)	Olives brine	<i>Lpb. pentosus</i> 2TP, 4TP, 4TG, 5TP, P13.3; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> P1.5
	Treated table olives ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O5; <i>Lpb. plantarum</i> : O1, O4
	Natural table olives of ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O11, O12, O15; <i>Lpb. plantarum</i> O13
	Brine from treated table olives ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O17, O18, O19, O20
	Brine from natural table olives ( <i>Cerignola</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> O24
	Table olives ( <i>Nocellara del Belice</i> cv.)	<i>Lpb. pentosus</i> OM24, OM53, OM52, OM62, OM50, OM13, OM14, OM35
Sourdough (SD)	Manioca	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> DKO22, 38AA
	Tapioca	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> DK36
	Fermented millet	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> CNRZ1890
	Ogi	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> NCIMB12120
	Altamura bread	<i>Lpb. plantarum</i> PA20S, PE2S
	Carasau bread	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 1069, 872

	Cornetto di Matera bread	<i>Lpb. paraplantarum</i> MTG8L, MTG30L; <i>Lpb. plantarum</i> MT2A11S, MT2D3S; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i> MTC13L; <i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> : MTD12L, MT2D20S, MTNTA3S, MT2D6S, MT2D7S, MT2D25L, MT2S, MTF13S, MTF1L, MTF28L, MTF9L
	Moddizzosu bread	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 954
	Spianata bread	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 1089
	Zichi bread	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 1505, 1513
Wine (W)	Wine	<i>Lpb. plantarum</i> B161
		<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> UT2.1, US3.1, UBS3
Human (H)	Human	<i>Lpb. plantarum</i> WCFS1
	Saliva	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NCIMB8826
Unknown (U)	Unknown	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> S2A19LPa

**Xylose fermentation:** strains were plated on MRS agar containing 10 g/L D-xylose and 0.16 g/L bromocresol purple (BCP) as pH indicator and incubated at 30°C for 48 h under anaerobic conditions. The change of substrate colour from purple to yellow and the presence of yellow colonies indicated the ability to use xylose.

**Tolerance to high NaCl concentrations:** strains were inoculated (10% v/v) in WMB supplemented with 7.5% w/v or 10% w/v NaCl and 0.16 g/L BCP. After incubation (30°C, 48 h, anaerobiosis) the change of colour from purple to yellow indicated the presence of survivors.

**Production of exopolysaccharides (EPS):** the strains were spotted on MRS agar plates containing 20 g/L maltose (M-MRS) or 20 g/L glucose (G-MRS) or 50 g/L sucrose (S-MRS) as carbon sources. At the end on incubation (30°C, 24 h, anaerobiosis), the strains which produced translucent slimy or ropy colonies were recorded as EPS producers.

**Production of  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA):** strains were inoculated (1% v/v) in WMB with or without 1% (w/v) monosodium glutamate (MSG). At the end of incubation (30°C, 24 h, anaerobiosis), accumulation of GABA was qualitatively evaluated by Thin Layer Chromatography (TLC).

**Antimicrobial activity:** inhibitory activity was tested by using a deferred antagonism assay using *Debaryomyces hansenii* DH-02, *Yarrowia lipolytica*, *Listeria innocua* BL86/26 and *Lpb. plantarum* C17, as strain indicators. At the end of incubation (24 h, 30°C), the diameter of inhibition zones around spots were measured using a calliper.

**Catalase activity:** catalase activity was qualitatively detected by bubble formation in presence of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% solution.

**Survival to phenolic compounds:** the strains were inoculated (10% v/v; 96 well microplates experiments) in mWMB supplemented with gallic acid (two-fold dilution from 100 to 6.25 mM),

protocatechuic acid (from 50 to 3.12 mM), 4-hydroxybenzoic acid (from 40 to 2.5 mM) and syringic acid (from 25 to 1.56 mM). After incubation (30°C, 24 h), the substrate turbidity (semi-quantitative assay) indicated the presence of survivors at a given concentration of phenolic compound.

***Hydrolysis of oleuropein and production of hydroxytyrosol:*** strains were used to inoculate (10% v/v) 96-well microplates containing MRS pH 7.4 (without meat extract) supplemented with 1 g/L oleuropein. At the end of incubation (7 days, 30°C, anaerobiosis), the supernatants were collected (12000 xg, 5 min, 4°C) and the oleuropein degradation and hydroxytyrosol formation were qualitatively evaluated through a TLC assay.

For each assay two biological replicates were carried out.

***Survival to olive mill wastewater:*** 15 strains (*Lpb. pentosus* OM13, OM14, OM24, OM50, OM53, OM52, OM62, 2TP, O17, O18; *Lpb. plantarum* subsp. *plantarum* C17, ISLCPT57, MT2A11S, WCFS1; *Lpb. plantarum* subsp. *argentoratensis* MTC13L) were used to test their survival in olive mill wastewater (OMW) obtained from olive oil production of *Leccino*, *Coratina* (oil mill located in Tricarico, Basilicata region, Italy) and *Cima di Melfi* (olive oil mill located in Grottaglie, Puglia region, Italy) cultivars. The strains inoculated (final population of  $10^7$  ufc/mL) in different concentrations (two-fold dilution from 50% to 0% v/v; 96-well microplates experiments) of OMWs for 15 min at 30°C. At the end of incubation, OMW-treated cells were inoculated (10% v/v) in WMB broth pH 6.8 to evaluate the presence of survivors (substrate turbidity; semi-quantitative assay) after 24 h of incubation at 30°C. The strains with highest resistance (*Lpb. pentosus* OM24 and O17, *Lpb. plantarum* C17 and MT2A11S) were further investigated for their tolerance to OMW (from 50% to 0% v/v) by using longer incubation times (15, 30, 60 and 120 min, at 30°C). Survivors were evaluated as described before. For each assay two biological replicates were carried out.

### ***2.1.1. Total phenolic content and phenolic profile of OMW***

OMW supernatants (3000 xg, 15 min, 4°C) of *Leccino*, *Coratina* and *Cima di Melfi* cv. (section 2.5) were filtered (Millex® filter 0.22 µm, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) and used for the detection of total phenolic content (TPC; Folin-Ciocalteu assay) and the analysis of phenolic profile by using a HPLC-DAD approach (Zotta et al., 2022).

## ***2.2. Identification and characterisation of yeast strains***

### ***2.2.1. Isolation and identification of yeasts***

Yeasts were isolated from milled and kneaded olive pastes, oil must and oil mill wastewater (OMW) collected during olive oil production from *Leccino*, *Coratina*, *Cima di Melfi*, *Frantoio*, *Ogliarola* cultivars (**Table 2**) in different oil mills of Apulia and Basilicata regions (South of Italy) and identified at species levels through the amplification and sequencing (external service, Genechron Srl, Roma, Italy) of ITS region and were genotypically characterised and de-duplicated by using RAPD-PCR (primers M13) and microsatellite-primed PCR (MSP-PCR, oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub>), as described in Giavalisco et al. (2023).

**Table 2. List of yeast strains used in this study.**

Source	Cultivar	Species and strain label
Milled olive paste	<i>Cima di Melfi</i> <sup>a</sup>	<i>Schwanniomyces polymorphus</i> Y1; <i>Nakazawaea molendinolei</i> Y2, Y4; <i>Candida boidinii</i> Y5, Y6; <i>Lachancea fermentati</i> Y3
	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y7, Y8
Kneaded olive paste	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y10; <i>N. wickerhamii</i> Y18
Oil must	<i>Frantoio</i> <sup>c</sup> , <i>Ogliarola</i> <sup>c</sup>	<i>L. fermentati</i> Y12; <i>N. molendinolei</i> Y13
	<i>Coratina</i> <sup>b</sup>	<i>N. wickerhamii</i> Y21
	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>L. fermentati</i> Y22
Olive mill wastewater	<i>Coratina</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y25; <i>L. fermentati</i> Y26
	<i>Leccino</i> <sup>b</sup>	<i>N. molendinolei</i> Y28

<sup>a</sup> Grottaglie, Apulia region; <sup>b</sup> Tricarico, Basilicata region; <sup>c</sup> Venosa, Basilicata region.

### 2.2.2. Growth ability and enzymatic activities of yeast strains

Seventeen strains identified at species level, i.e. *Candida boidinii* (2), *Lachancea fermentati* (4), *Nakazawaea molendinolei* (8), *N. wickerhamii* (2) and *Schwanniomyces polymorphus* (1), were screened for the following activities, as described in Giavalisco et al. (2023):

**Growth at low temperature:** strains were cultivated in MYPG pH 7.0, at 28 (control), 20, 15 and 10°C, up to 7 days. At time intervals (1, 3, 5, 7 d of incubation), A<sub>600</sub> values were measured. All trials were carried-out in duplicates.

**Protease activity:** strains was spotted (10 µL) on MYPG agar (MYPGA) containing 20 g/L casein. At the end of incubation (28°C, up to 7 days) a clear halo around colonies indicated a protease activity.

**β-glucosidase activity:** strains were spotted (10 µL) on medium containing 1 g/L yeast extract, 1 g/L peptone, 2 g/L glucose, 0.01 g/L ferric ammonium citrate, 0.3 g/L esculin. At the end of incubation (28°C, 48 h), a dark halo around colonies indicated a β-glucosidase activity.

**Lipolytic activity:** strains were spotted (10 µL) on Tributyrin agar medium containing 1% (w/v) tributyrin; at the end of incubation (28°C, up to 7 days) a clear halo around colonies indicated a lipolytic activity.

**Esterase activity:** strains were spotted (10 µL) on Tween Agar medium, containing 10 g/L peptone, 5 g/l NaCl, 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub>, 5 g/L Tween 80 (added after sterilisation) and 15 g/L agar. At the end of incubation (28°C, up to 10 days) a clear halo around colonies indicated an esterase activity.

**Peroxidase activity:** peroxidase activity was qualitatively detected (bubble formation) by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% v/v) on MYPG-colonies (28°C, 48 h).

**Hydrolysis of oleuropein and production of hydroxytyrosol:** This activity was evaluated as described for *Lactiplantibacillus* strains (see section 2.1.), by using as incubation medium and T°C, respectively, MYPG and 28°C.

Survival to olive mill wastewater: Survival of yeasts to phenol-rich matrices was evaluated by using different concentration of OMW, as described for *Lactiplantibacillus* strains (see section 2.1.).

Radical scavenging activity of yeast strains: The capability to remove 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH)-radicals was measured as described by Ciafardini and Zullo (2020), while the hydroxyl radical scavenging activity was evaluated as described by Wang et al. (2009).

Biofilm formation: This activity was evaluated by using the crystal violet assay as described by Camiolo et al. (2017).

### 2.2.3. Survival of yeasts in extra virgin olive oil

Yeasts were individually inoculated (final population of  $10^6$  cfu/mL) in two extra virgin olive oils (3-months old EVOOs from *Leccino* and *Coratina* cultivars). Uninoculated EVOOs (U-EVOO) was used as control. All samples were incubated in the dark, for 6 months at 20°C and, at 1-month intervals, the yeast viability was evaluated. Specifically, olive oil samples were serial diluted (1:10) in sterile saline solution (PS) and each dilution, after a vigorous stirrer on vortex, were plated on MYPGA and incubated at 28°C for 3 days, for the recovery of yeast survivors.

### 2.3. Strain selection and inoculum in olive oil must

The strains *Lpb. pentosus* O17 and *N. wickerhamii* Y18 have been selected to be used as inoculum in oil musts in order to improve the physical-chemical, organoleptic and sensory properties of EVOO. Specifically, the strains were selected on the basis of their tolerance to phenolic compounds (as the oil must is a phenolic compound-rich matrix) and for the capability to hydrolyse oleuropein (the bitter glycoside of olive fruits) and to form hydroxytyrosol (an antioxidant compound).

*Lpb. pentosus* O17 was used in the olive oil campaign of 2020/2021, while *N. wicheramii* Y18 was used in the olive oil campaign of 2021/2022 and 2022/2023 years. The strains were cultivated (*Lpb. pentosus* O17 in WMB pH 6.8, 16 h, 30°C; *N. wicheramii* Y18 in MYPG, 24 h at 28°C) in bioreactor (3 L- working volume; Applikon) to obtain high-density cultures ( $10^{10}$  cfu/mL) to be used as inoculum in olive moist (final population of  $10^7$  cfu/mL and  $10^6$  cfu/mL, respectively, for O17 and Y18).

The inoculated oil musts (see **Figure 9**) was incubated overnight (16 h) at room T°C and then submitted to different extraction processes, as previously described. Uninoculated musts, and derived oil samples, were used for comparison. At the end of oil must incubation, the survival of *Lpb. pentosus* O17 and *N. wicheramii* Y18, as well as the presence of other microbial groups, were evaluated by plate count on appropriated substrates (mMRS for LAB; VRBGA for *Enterobacteriaceae*; Agar gelisato for total bacterial count; OGYE for yeasts and moulds).

The effect of *Lpb. pentosus* O17 and *N. wicheramii* Y18 on oil samples was evaluated as previously described.

### 2.4. Statistical analyses

All statistic and graphs were performed by using Systat 13.0 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

### 3. Results and discussion

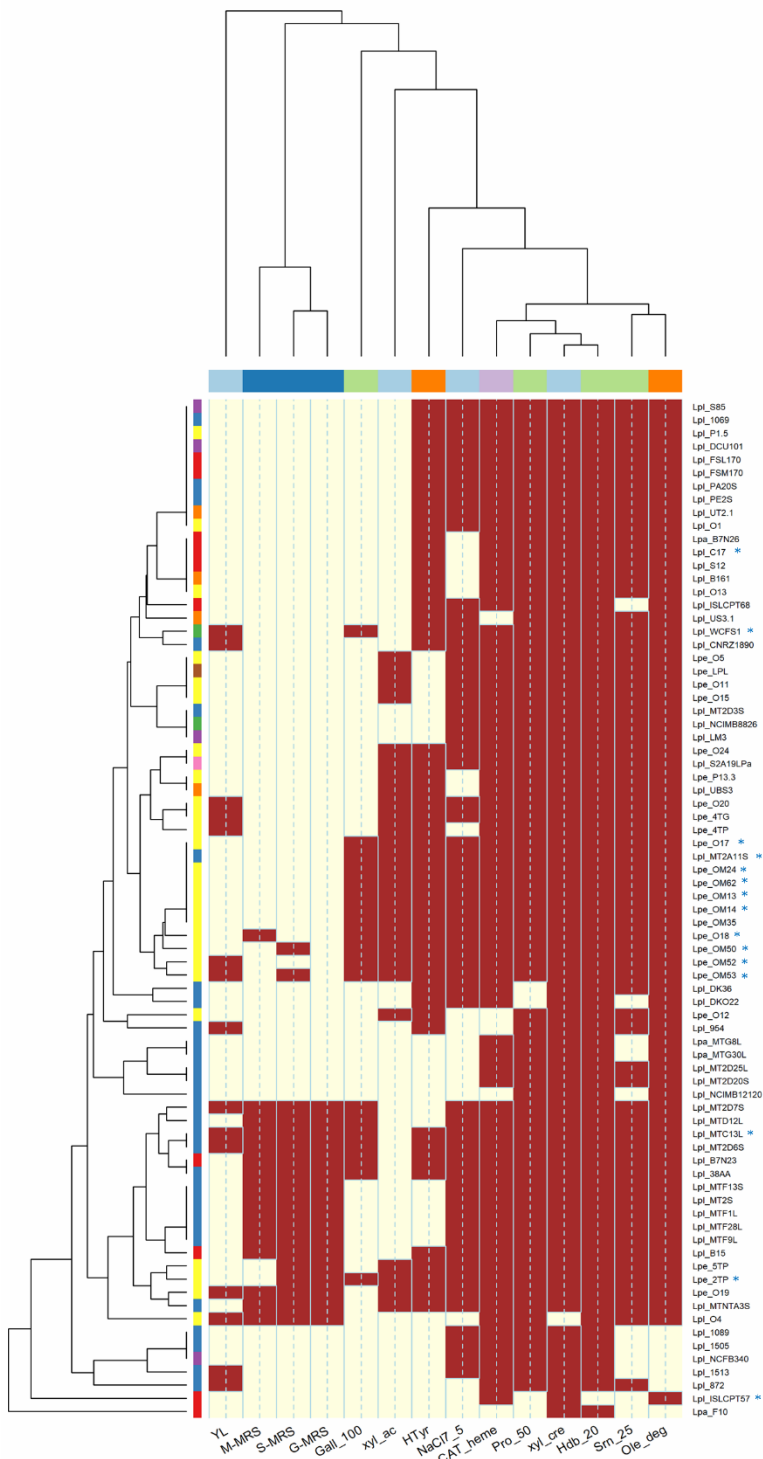
#### 3.1. Identification and characterisation of *Lactiplantibacillus* strains

All strains (with exception of *Lpb. plantarum* O4) were able to grow in presence of xylose (**Figure 1**), but only 27 were able to produce acid. No strains were able to grow in presence of 10% NaCl, while most of them (n. 58) grew with 7.5% NaCl. Sixteen strains produced EPS from both glucose, maltose and sucrose; *Lpb. pentosus* O18 formed EPS only from maltose, while *Lpb. pentosus* O19, OM50 and OM53 only from sucrose; no strain was able to produce dextran. The *Lactiplantibacillus* strains screened in this study did not show antagonistic activity against *Lpb. plantarum*, *D. hansenii* and *L. innocua*. Only 15 strains had inhibitory activity against *Y. lipolytica*.

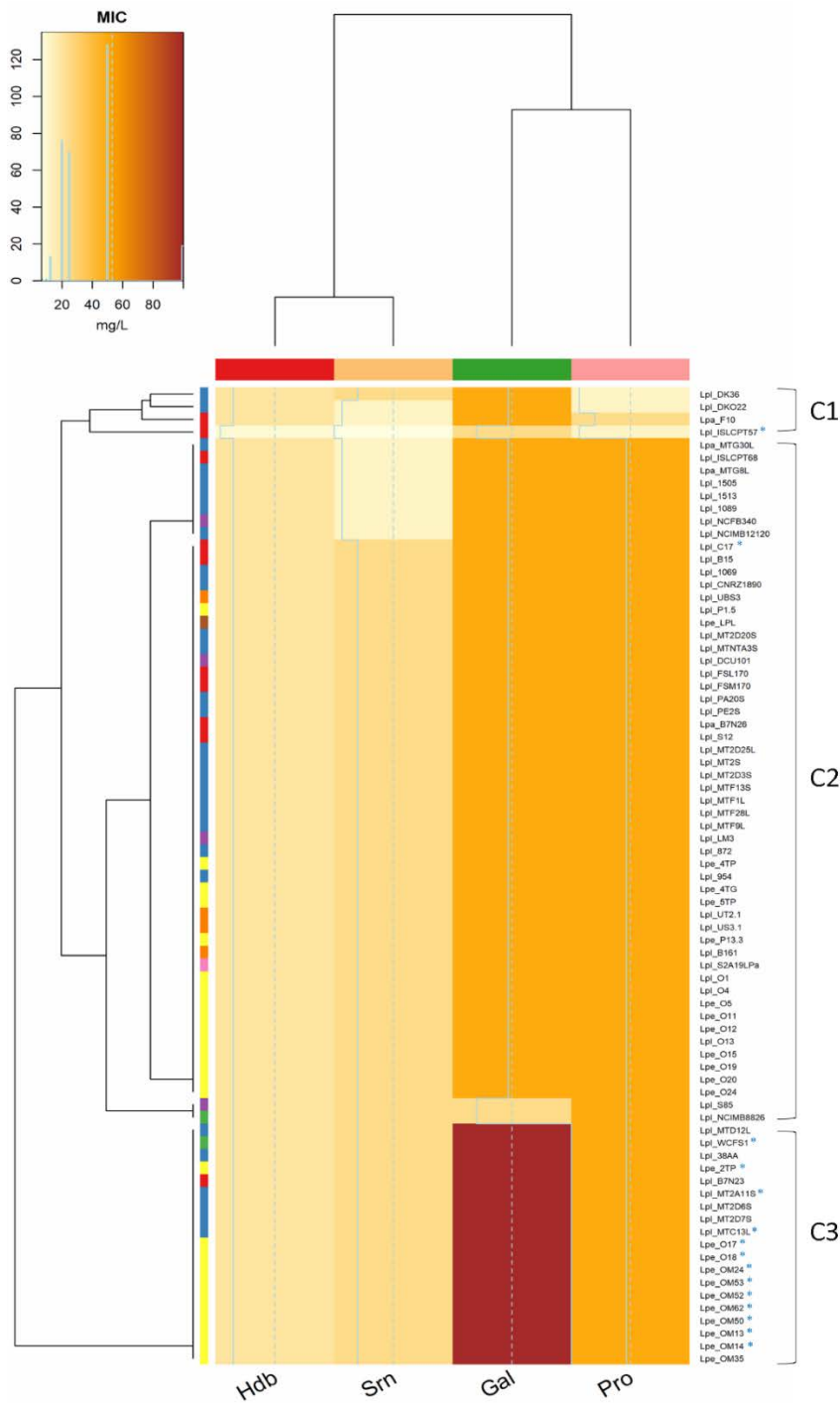
None of the strains was able to produce GABA when cultivated in presence of sodium glutamate, while most of them were able to synthesise heme-catalase, the main H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading enzyme in LAB.

Only 19 strains (mostly *Lpb. pentosus* from olives) were able to grow in presence of 100 mM gallic acid, while most strains (n. 73) grew in medium supplemented with 50 mM protocatechuic acid and (n. 66) 25 mM syringic acid (**Figure 1**). Hydroxybenzoic acid had the highest toxicity and none of the strains was able to grow at the highest concentration (40 mM). On the contrary, lower levels of phenolic acids (gallic ≤ 50 mM, protocatechuic ≤ 25 mM, hydroxybenzoic ≤ 20 mM, syringic ≤ 12.5 mM) did not inhibit the growth of strains. Analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC; **Figure 2**) allowed to identify the most tolerant lactobacilli (isolated from olives and sourdoughs; cluster C3), characterized by the greater resistance to gallic acid (100 mM).

In this study, the capability to degrade oleuropein was widespread among the *Lactiplantibacillus* strains (n. 71; β-glucosidase activity), while the capability to release hydroxytyrosol (esterase activity) was found only in 50 lactobacilli (**Figure 1**). The ability to form hydroxytyrosol is a desired feature among *Lactiplantibacillus* strains, as it may improve the antioxidant properties of olives-derived products, providing benefits for human health; free hydroxytyrosol, in fact, is one of the most powerful free radical scavengers as well as a metal chelator, exerting cardioprotective, anticancer, endocrine regulator, antimicrobial potential effects (*in-vitro* and *in-vivo* trials). To this purpose, EFSA indicated that the consumption of olive oil containing hydroxytyrosol or tyrosol as well as their derivatives (daily intake of 5 mg Hyt/20 g olive oil) contributes to protect blood lipids from oxidative stress (Commission Regulation EU n.432/2012).



**Figure 1. Correlation among technological properties of *Lactiplantibacillus* strains. Red box: positive; yellow box: negative. Code of columns dendrogram: YL, antimicrobial activity against *Yarrowia lipolytica*; M-MRS, S-MRS, G-MRS production of exopolysaccharides on maltose, sucrose and glucose, respectively; Gall\_100 (100 mM gallic acid), Pro\_50 (50 mM protocatechuic acid), Hdb\_20 (20 mM 4-hydroxybenzoic acid) and Srn\_25 (25 mM syringic acid) referred to phenolic compound tolerance; xyl\_cre, growth on xylose; xyl\_ac, acid production from xylose; NaCl7\_5, salt tolerance; CAT\_heme, catalase activity, Ole\_deg, oleuropein hydrolysis, Htyr, hydroxytyrosol formation. Row dendrogram (similarity relationships among strains): LAB species: *Lpl*, *Lpb. plantarum*, *Lpa*, *Lpb. paraplantarum*, *Lpe*, *Lpb. pentosus*; isolation source: vegetables (violet), sourdoughs (blue), olives and derived products (yellow), dairy products (red), wine (orange), human sources (green), meat products (brown), unknown sources (pink) (da Zotta et al., 2022).**



**Figure 2.** Minimum inhibitory concentration (MIC, mg/L) of 4-hydroxybenzoic (Hdb, 40-2.5 mM), syringic (Srn, 25-1.56 mM), gallic (Gal, 100-6.25 mM) and protocatechuic (Pro, 50-3.12 mM) acids. Phenolic compounds concentration is defined by different colours shades, from yellow (0 mg/L) to red (100 mg/L). Row dendrogram: LAB species: Lpl, *Lpb. plantarum*, Lpa, *Lpb. paraplantarum*, Lpe, *Lpb. pentosus*; isolation source: vegetables (violet), sourdoughs (blue), olives and derived products (yellow), dairy products (red), wine (orange), human sources (green), meat products (brown), unknown sources (pink). Rows dendrogram shows similarity relationships between strains based on phenolic compounds tolerance. Columns dendrogram shows the similarity among the effect of phenolic compounds on *Lactiplantibacillus* strains (da Zotta et al., 2022).

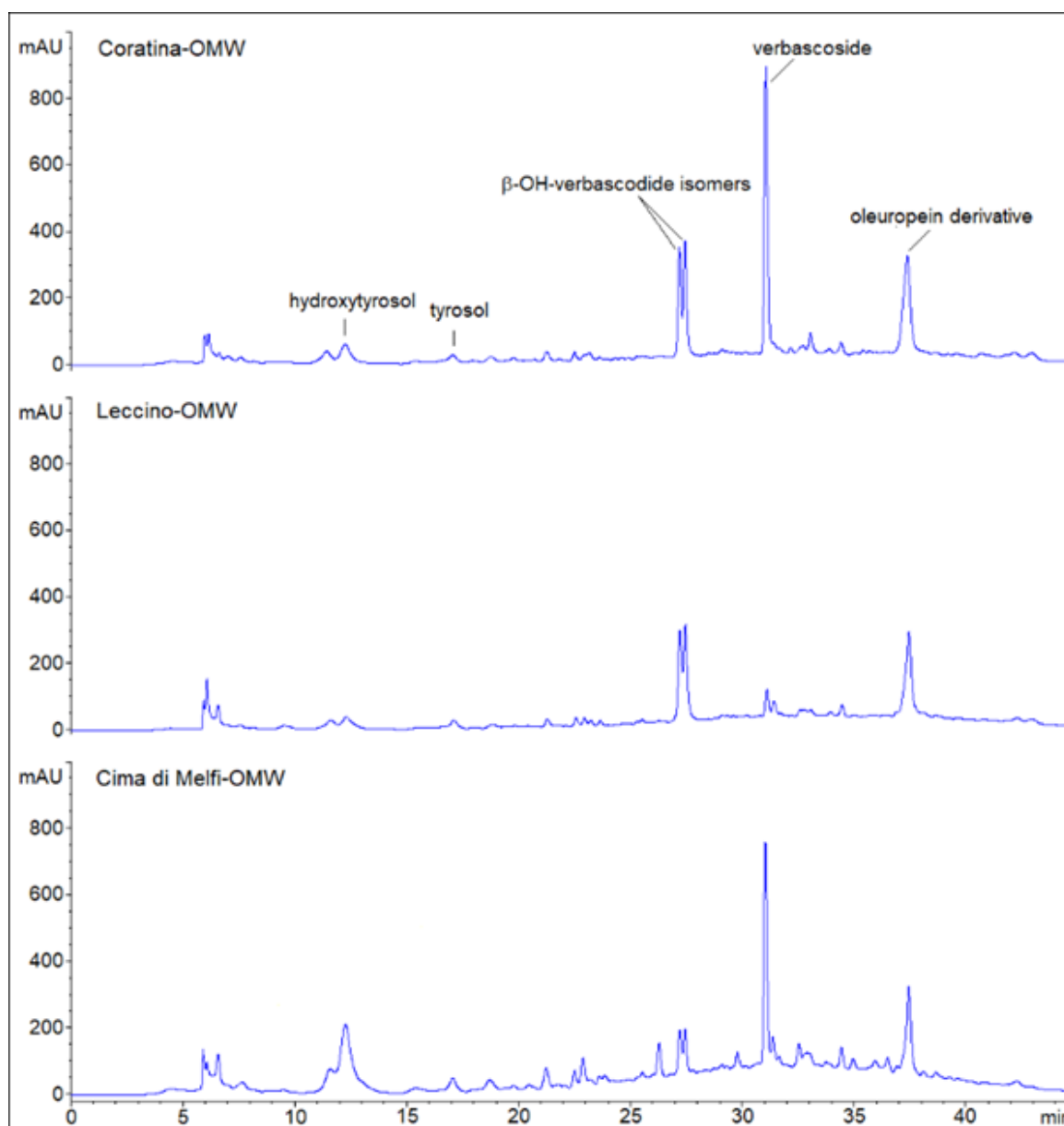
In this study, no strain was able to survive to undiluted OMW, while tolerance to diluted OMWs (15 min incubation) depended on the cultivar (**Table 3**). *Coratina* affected strain survival to a greater extent, while *Cima di Melfi* provided the least stressful conditions. The best tolerant strains were *Lpb. pentosus* O17 and OM24 (from olives), *Lpb. plantarum* C17 (from cheese), *Lpb. plantarum* MTDA11S (from sourdoughs).

**Table 3. Strains survival after exposure (15 min) to different concentrations of olive mill wastewater (OMW) derived from olive oil production of *Leccino*, *Coratina* and *Cima di Melfi* cultivars (da Zotta et al., 2022).**

Strains	Species	Dose causing $\geq 7$ -log reductions <sup>a</sup>		
		OMW <sup>b</sup> <i>Leccino</i>	OMW <sup>b</sup> <i>Coratina</i>	OMW <sup>b</sup> <i>Cima di Melfi</i>
O17	<i>Lpb. pentosus</i>	50	25	50
O18	<i>Lpb. pentosus</i>	25	12.5	50
OM24	<i>Lpb. pentosus</i>	12.5	12.5	50
OM53	<i>Lpb. pentosus</i>	25	6.25	50
OM52	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	6.25	25
OM62	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	6.25	25
OM50	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	6.25	25
OM13	<i>Lpb. pentosus</i>	12.5	6.25	25
OM14	<i>Lpb. pentosus</i>	6.25	12.5	25
2TP	<i>Lpb. pentosus</i>	12.5	6.25	25
MT2A11S	<i>Lpb. plantarum</i>	25	25	25
WCFS1	<i>Lpb. plantarum</i>	12.5	6.25	25
C17	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	12.5	25	25
ISLCPT57	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	6.25	3.12	12.5
MTC13L	<i>Lpb. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	12.5	6.25	12.5

<sup>a</sup> The concentration of cells used to inoculate the different percentage (%) of OMW was 7-log cfu/mL. <sup>b</sup> OMW was diluted with NaCl 0.85% (w/v); the % of OMW corresponds to the following dilution (d): OMW 50% = 2d; OMW 25% = 4d; OMW 12.5% = 8d; OMW 6.25% = 16d; OMW 3.12% = 32d

The total polyphenol content (TPC) and the phenolic profile were evaluated for all OMW samples. *Cima di Melfi* had the highest TPC ( $11.9 \pm 0.3$  g/Kg) compared to *Coratina* OMW ( $8.8 \pm 0.2$  g/kg) and *Leccino* ( $7.2 \pm 0.3$  g/kg) cultivars. Verbascoside,  $\beta$ -OH-verbascoside isomers and an oleuropein derivative were the main phenolic compounds of OMWs (Figure 7), although their occurrence was cultivar-dependent.

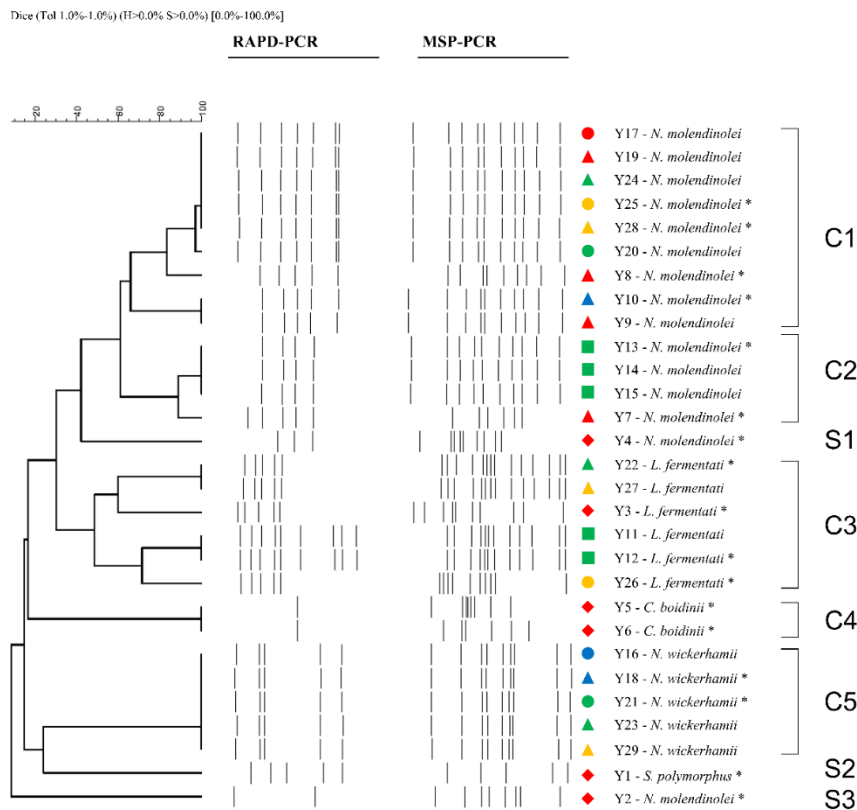


**Figure 3.** Phenolic profiles (HPLC chromatograms) of olive mill wastewater (OMW) resulting from olive oil production of *Leccino*, *Coratina* and *Cima di Melfi* cultivars. Peaks have been putatively assigned on the basis of retention time values (min), and by comparing them with literature data and UV spectra (280 nm) (da Zotta et al., 2022).

### 3.2. Identification and characterization of yeast strains

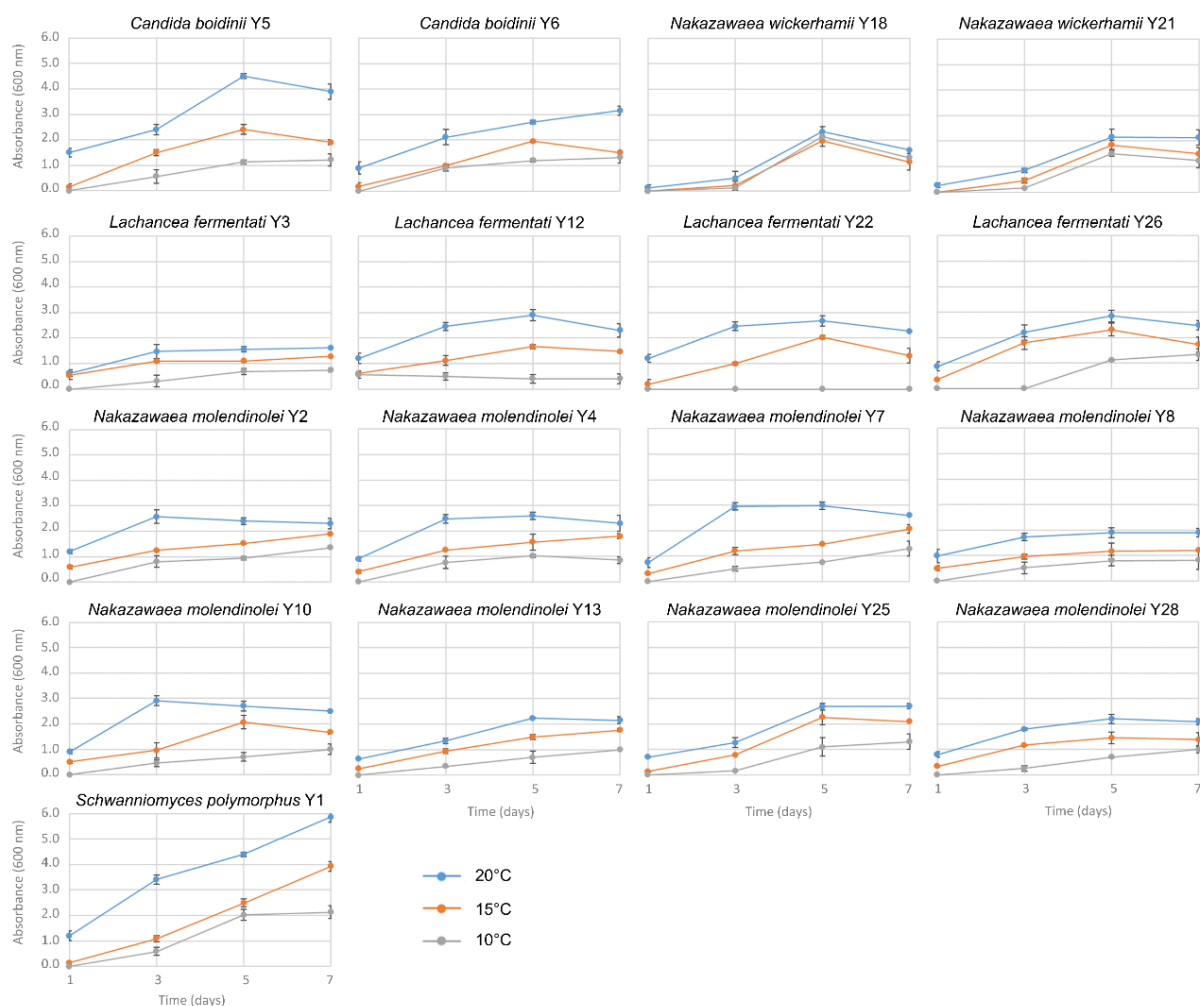
A total of 29 isolates (**Table S4**) were recovered during olive-oil production in oil mills of Apulia and Basilicata regions, de-duplicated by using RAPD-PCR and MSP-PCR and identified by sequencing of ITS region. ITS-based classification indicated that yeast isolates belonged to *Candida boidinii* (2), *Lachancea fermentati* (6), *Nakazawaea molendinolei* (15), *N. wickerhamii* (5) and *Schwanniomyces polymorphus* (1) species (**Figure 4**).

A high species diversity was found among oil-born yeasts. Yeast occurrence in olive oil is affected by several factors, including geographical area, agricultural practices, olive cultivar, chemical composition of drupes, stage of fruit maturation, harvest timing, and the extraction process (Guerrini et al., 2019; Zullo and Cifardini, 2020a, 2022). Some species (e.g. *Nakazawaea molendinolei*, *N. wickerhamii*) seem to be related to the production environment (e.g., oil mill equipment) rather than to the microbiota of olive drupes, while other such as *Schwanniomyces polymorphus* are sporadic contaminants resulting from oil mill environment or from olives contamination with soil materials.



**Figure 4. Cluster analysis of RAPD-PCR and MSP-PCR band profiles of yeast strains isolated during olive-oil production in oil mills of Apulia and Basilicata regions. Clusters were labelled from C1 to C5, while single strains from S1 to S3. Colours indicate the isolation source: red, milled olive paste; blue, kneaded olive paste; green, oil must; yellow, olive mill wastewater. Symbols indicate olive cultivar: triangle, *Leccino*; circle, *Coratina*; diamond, *Cima di Melfi*; square, blended cultivars (*Frantoio*, *Ogliarola*). \* Strains selected for characterisation trials and for survival in EVOO (da Givalisco et al., 2023).**

Olive oil is generally stored at 15-17°C and, therefore, the ability of yeasts to grow at low temperatures is crucial for the quality of products. In this study, several strains were able to grow at 20°C and 15°C; lower temperatures (10°C), instead, significantly impaired growth performances for most of strains (**Figure 5**). *L. fermentati* Y22 was completely inhibited at 10°C.



**Figure 5. Absorbance values of yeast strains cultivated for 7 days at 20°C (blue lines), 15°C (orange lines) and 10°C (grey lines). Absorbance values were detected after 1, 3, 5 and 7 days of incubation (da Gialisco et al., 2023).**

Oil-born yeasts have been widely investigated for the enzymatic activities that can affect, positively or negatively, the EVOO quality (Zullo and Ciafardini, 2022). The results of enzymatic activities tested in this study was reported in **Table 4**. All of strains had a  $\beta$ -glucosidase activity, while none of them exhibited lipolytic activities. Esterase was present only in *N. wickerhamii* strains. Capability to degrade  $H_2O_2$  was widespread among strains (with exception of the two *Candida boidinii*), while protease activity was strain-dependent. Olive fruits, and therefore the derived products, are considered phenolic compound-rich matrices. Oleuropein, the glycoside associated to bitter taste, is certainly the main phenolic compound in olive drupes. Degradation of oleuropein and synthesis of hydroxytyrosol was not widely distributed among yeast strains, unlike to the olive-associated *Lactiplantibacillus* strains (see section 3.1.). In this study, in fact, only the two *N. wickerhamii* strains, which harbour both  $\beta$ -glucosidase and esterase activities, were able to hydrolyse oleuropein and form hydroxytyrosol. Tolerance to phenolic compounds was evaluated by exposing yeasts to different concentrations of OMW, also used for the screening of *Lactiplantibacillus* strains. Yeasts strains were highly tolerant to OMW.

**Table 4. Enzymatic activities, oleuropein hydrolysis and hydroxytyrosol formation (da Giavalisco et al., 2023).**

Species	Strains	Enzymatic activity					Oleuropein degradation	
		$\beta$ -glu <sup>a</sup>	Est <sup>b</sup>	Lip <sup>c</sup>	Perox <sup>d</sup>	Prot <sup>e</sup>	OLE <sup>f</sup>	Htyr <sup>g</sup>
<i>Candida boidinii</i>	Y5	1	0	0	0	1	0	0
	Y6	1	0	0	0	1	0	0
<i>Lachancea fermentati</i>	Y3	1	0	0	1	0	0	0
	Y12	1	0	0	1	1	0	0
	Y22	1	0	0	1	0	0	0
	Y26	1	0	0	1	0	0	0
<i>Nakazawaea molendinolei</i>	Y2	1	0	0	1	1	0	0
	Y4	1	0	0	1	1	0	0
	Y7	1	0	0	1	1	0	0
	Y8	1	0	0	1	0	0	0
	Y10	1	0	0	1	1	0	0
	Y13	1	0	0	1	1	0	0
	Y25	1	0	0	1	1	0	0
	Y28	1	0	0	1	0	0	0
<i>Nakazawaea wickerhamii</i>	Y18	1	1	0	1	0	1	1
	Y21	1	1	0	1	0	1	1
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	Y1	1	0	0	1	0	0	0

<sup>a</sup>  $\beta$ -glucosidase activity; <sup>b</sup> Esterase activity; <sup>c</sup> Lipolytic activity; <sup>d</sup> Peroxidase activity; <sup>e</sup> Protease activity; <sup>f</sup> Oleuropein hydrolysis; <sup>g</sup> Hydroxytyrosol formation; 1: presence, 0: absence.

Yeasts can produce natural antioxidants (e.g., carotenoids, citric acid, ascorbic acid, tocopherols, glutathione, cell wall-associated  $\beta$ -glucans) that may inhibit the oxidative degradation of lipids (limiting the generation of peroxides) and improve the human health. In this study, a low variability in DPPH-radical scavenging ability was found among yeast strains, while the ability to degrade hydroxyl-radicals was strain-dependent and ranged from 66% (*N. molendinolei* Y7) to 28% (*S. polymorphus* Y1; **Figure 6**). *N. wickerhamii* Y18 and Y22 were the only strains that exhibited a potential ability in biofilm formation, after both 24 and 48 h of incubation, while the other strains had low fractions of adherent cells (**Figure 7**).

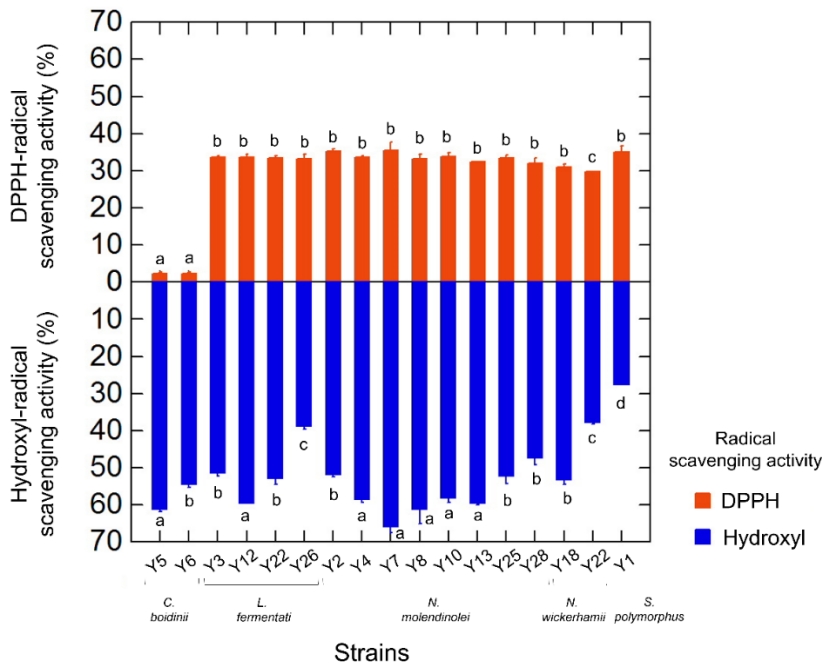


Figure 6. DPPH and hydroxyl radical scavenging activities of yeasts. Letters on plots bar indicate significant differences (Turkey’s HSD,  $p \leq 0.001$ ) in scavenging activity within strains (da Givalisco et al., 2023).

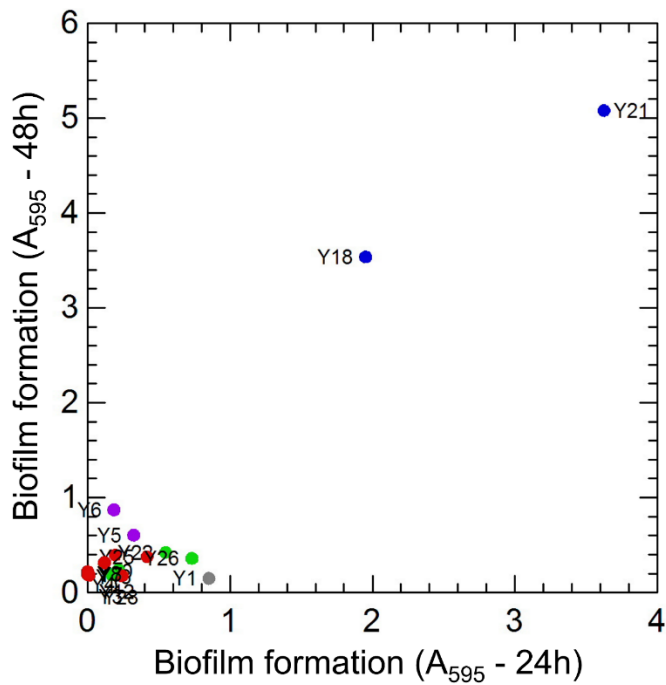
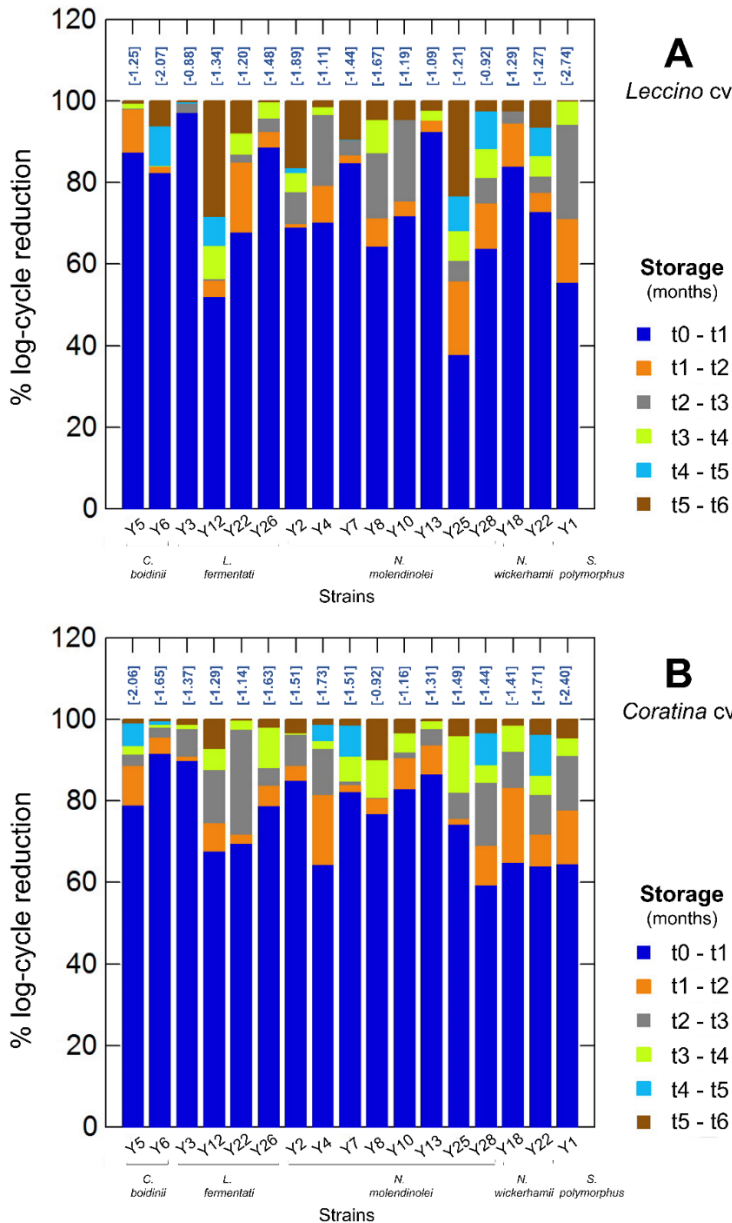


Figure 7. Biofilm formation (absorbance values at 595 nm, A<sub>595</sub>) of yeast strains after 24 h and 48 h of incubation. Symbol colour: purple, *Candida boidinii*; green, *Lachancea fermentati*, red, *Nakazawaea molendinolei*, blue, *N. wickerhamii*, grey, *Schwanniomyces polymorphus* (da Givalisco et al., 2023).

**Yeast survival in EVOO**

A high level of survival (generally lower than 2 log-cycle reduction over 6 months) was observed for all yeasts in both *Leccino* and *Coratina* EVOOs (**Figure 8**). The greatest reduction in cell viability, however, was already observed after the first month of storage (range t0-t1; blue bar in **Figure 8**). Over the storage period, no microbial growth was observed (at detectable limits, > 9 cfu/mL) in uninoculated control oils, confirming that the detected survivors were the inoculated yeasts. Consistent with previous data, we confirmed that yeasts are the microbial group that mainly survive in olive oil.



**Figure 8.** Yeast survival in *Leccino*-EVOO (A) and *Coratina*-EVOO (B) expressed as percentage (%) of log-cycle reduction over 6 months of storage. For each strain, the loss in survival was calculated monthly (incubation range t0-t1, t1-t2, t2-t3, t3-t4, t4-t5, t5-t6) as a reduction of  $\log(N/N_0)$ , where  $N_0$  and  $N$  are the number of cells before and after incubation at each month of storage. The number in brackets, over the bars, indicate the overall log-cycle reduction after 6 months of storage (da Gialalisco et al., 2023).

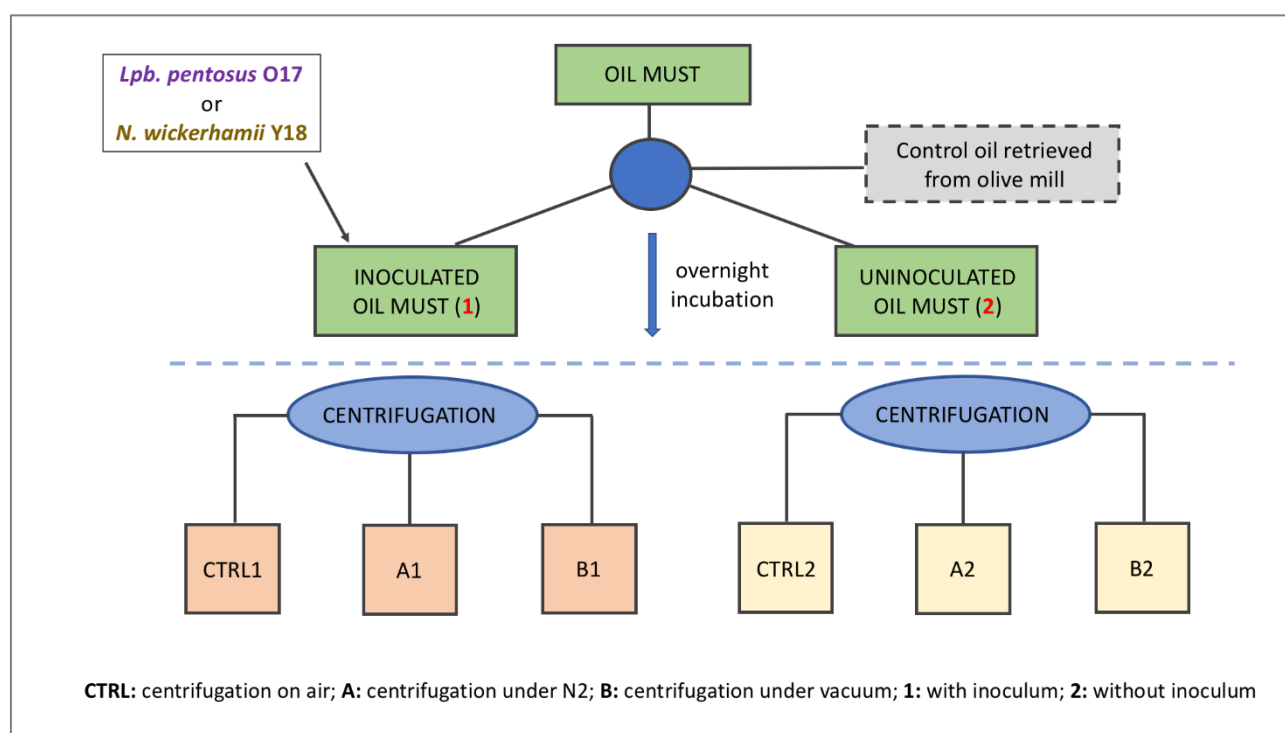
### 3.3. Strain selection and inoculum in olive oil must

The strains *Lpb. pentosus* O17 and *N. wickerhamii* Y18 were used to inoculate oil musts in order to improve the physical-chemical, organoleptic and sensory properties of EVOO.

*Lpb. pentosus* O17 was used as inoculum in oil musts (Leccino and Coratina cv; olive mill located in Tricarico, MT, South of Italy) retrieved from olive oil campaign of 2020/2021. The experimental design for the production of innovative oils with or without the microbial inoculum was schematically reported in **Figure 9** and previously described in detail.

*Lpb. pentosus* O17 had a low survival in oil must, as showed in **Figure 10**, and therefore, for the subsequent trials (2021/2022, 2022/2023 years; oil must from *Coratina* cv) the yeast *N. wickerhamii* Y18 was used as inoculum, because of its greater tolerance to phenolic compounds. Our results, in fact, demonstrated that *N. wickerhamii* Y18 was able to survive after the overnight incubation maintaining the population level of inoculum (**Figure 11**).

The strain *N. wickerhamii* Y18 had a significant effect on the properties of EVOO samples, as previously described, could be used to improve the chemical and organoleptic features of the product.



**Figure 9: Schematic representation of the experimental design for the production of traditional and innovative EVOO. The above scheme was used for the olive oil campaign 2020/2021 and 2021/2022; for the olive oil campaign 2022/2022 the under vacuum treatment was discarded from the extraction process.**

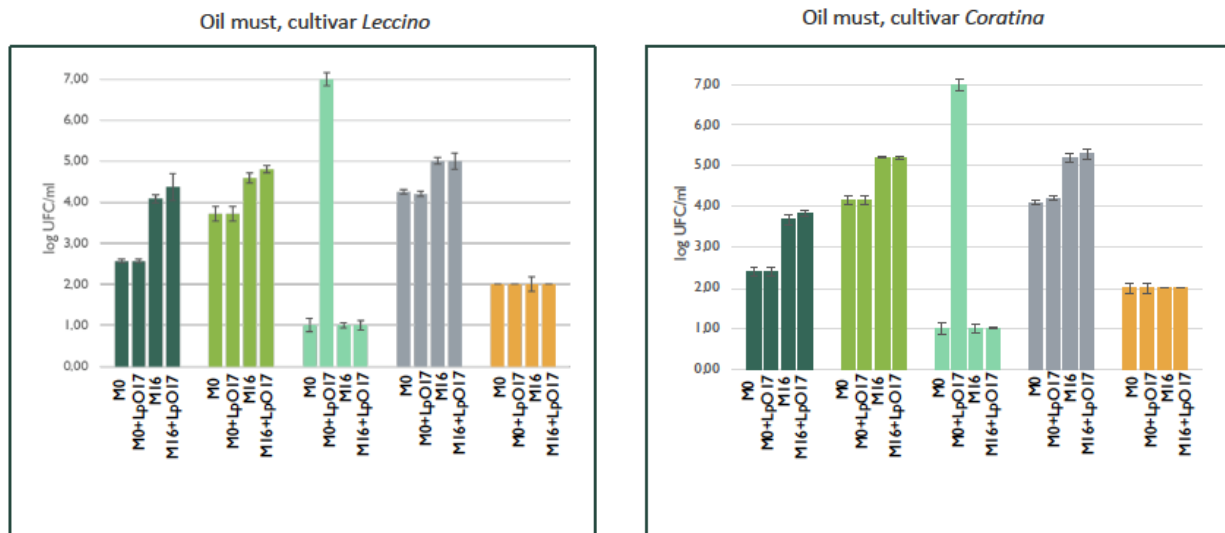


Figure 10: Survival of *Lpb. pentosus* O17 in oil must from *Leccino* and *Coratina* cultivars. M0 and M16, respectively, uninoculated oil must at time 0 h and after 16 h of incubation. M0+LpO17 and M16+LpO17, respectively, inoculated oil must at time 0 h and after 16 h of incubation. Green bars: *Enterobacteriaceae*; light green bars: total bacterial count; light blue bars: LAB including *Lpb. pentosus* O17; grey bars: yeasts; orange bars: moulds.

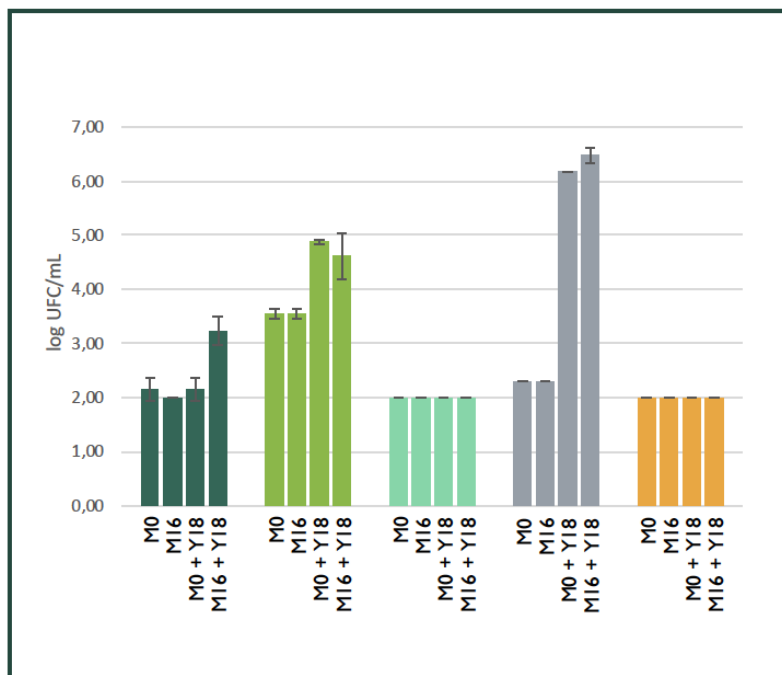


Figure 11: Survival of *N. wicheramii* Y18 in oil must from *Coratina* cultivar. M0 and M16, respectively, uninoculated oil must at time 0 h and after 16 h of incubation. M0+Y18 and M16+Y18, respectively, inoculated oil must at time 0 h and after 16 h of incubation. Green bars: *Enterobacteriaceae*; light green bars: total bacterial count; light blue bars: LAB; grey bars: yeasts including *N. wicheramii* Y18; orange bars: moulds.

## References

- [1] Camiolo S., Porru C., Benítez-Cabello A., Rodríguez-Gómez F., Calero-Delgado B., Porceddu A., Budroni M., Mannazzu I., Jiménez-Díaz R., Arroyo-López F.N. 2017. Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards Genomic Science*. 12, 1-14. DOI: 10.1186/s40793-017-0281-z.
- [2] Ciafardini G., Zullo B.A. 2018. Virgin olive oil yeasts: A review. *Food Microbiology*. 70, 245-253. DOI: 10.1016/j.fm.2017.10.010.
- [3] Ciafardini G., Zullo B.A. 2020. In vitro potential antioxidant activity of indigenous yeasts isolated from virgin olive oil. *Journal of Applied Microbiology*. 128, 853-861. DOI: 10.1111/jam.14520.
- [4] Fancello F., Multineddu C., Santona M., Deiana P., Zara G., Mannazzu I., Budroni M., Dettori S., Zara S. 2020. Bacterial biodiversity of extra virgin olive oils and their potential biotechnological exploitation. *Microorganisms*. 8, 97. DOI: 10.3390/microorganisms8010097.
- [5] Giavalisco M., Zotta T., Parente E, Siesto G., Capece A., Ricciardi A. 2023. Effect of oil-born yeasts on the quality of extra-virgin olive oils of Basilicata region. *International Journal of Food Microbiology*. 386, 110041. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110041.
- [6] Guerrini S., Mari E., Barbato D., Granchi L., 2019. Extra virgin olive oil quality as affected by yeast species occurring in the extraction process. *Foods*. 8, 457. DOI: 10.3390/foods8100457.
- [7] Mari E., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. 2016. Enumeration and rapid identification of yeasts during extraction process of extra virgin olive oil in Tuscany. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 32, 93-103. DOI: 10.1007/s11274-016-2049-9.
- [8] Zotta T., Giavalisco M., Parente E., Picariello G., Siano F., Ricciardi A. 2022. Selection of *Lactiplantibacillus* strains for the production of fermented table olives. *Microorganisms*, 10, 625. DOI: 10.3390/microorganisms10030625.
- [9] Zullo B.A., Ciafardini G. 2020a. Virgin olive oil quality is affected by the microbiota that comprise the biotic fraction of the oil. *Microorganisms*. 8, 663. DOI: 10.3390/microorganisms8050663.
- [10] Zullo B.A., Ciafardini G. 2020b. Differential microbial composition of monovarietal and blended extra virgin olive oils determines oil quality during storage. *Microorganisms*. 8, 402. DOI: 10.3390/microorganisms8030402.
- [11] Zullo B.A., Venditti G., Ciafardini G. 2021. Effects of the filtration on the biotic fraction of extra virgin olive oil. *Foods*. 10, 1677. DOI: 10.3390/foods10081677.
- [12] Zullo B.A., Ciafardini G. 2022. Role of yeasts in the qualitative structuring of extra virgin olive oil. *Journal of Applied Microbiology*. 132, 4033-4041. DOI: 10.1111/jam.15478.

---

# Effetto di tecnologie di estrazione innovative sulla qualità, la stabilità ossidativa e le caratteristiche organolettiche degli oli extravergini di oliva

---

*Nicola Condelli\*, Maria Di Cairano, Teresa Scarpa, Fernanda Galgano*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

## **Riassunto**

La composizione chimica dell'olio di oliva e quindi la qualità sensoriale e nutrizionale dello stesso è influenzata da diversi fattori fra i quali quelli tecnologici. Fra i vari composti presenti i fenoli rivestono un ruolo fondamentale in quanto responsabili dell'intensità di alcuni driver sensoriali quali l'amaro e il piccante e perché direttamente coinvolti nella stabilità ossidativa in relazione alle loro caratteristiche antiossidanti.

Questo lavoro focalizza mira a fornire indicazioni circa l'effetto delle modalità di chiarificazione e dell'inoculo del mosto oleoso con microrganismi sulla qualità, la stabilità ossidativa e le caratteristiche organolettiche degli oli extravergini di oliva.

I campioni sperimentali sono stati caratterizzati dal punto di vista sensoriale e per ognuno di essi sono stati determinati il contenuto in polifenoli totali, l'indice di amaro e la stabilità ossidativa.

L'inoculo del mosto oleoso con il lievito *N. wicheramii* Y18 ha influenzato significativamente la qualità degli oli prodotti in termini di maggior contenuto di fenoli totali e di una migliore stabilità ossidativa unitamente ad un colore più bilanciato con note di verde più intense.

**Parole chiave:** olio extravergine di oliva, fenoli, stabilità ossidativa

## **1. Introduzione**

L'olio extravergine di oliva è universalmente riconosciuto come simbolo della dieta mediterranea (Willett et al., 1995). Diversi studi hanno mostrato una forte relazione tra l'adesione a questo modello nutrizionale e una minore incidenza di obesità, aterosclerosi, ipertensione, diabete, malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative e altre malattie croniche e metaboliche (Solfrizzi et al., 2011; D'Alessandro & Pergola, 2015). Le proprietà salutari dell'olio di oliva sono associate alla presenza di acidi grassi monoinsaturi (MUFA), in particolare acido oleico che rappresenta quasi l'80% della componente lipidica totale (Tripoli et al., 2009), una presenza equilibrata di acidi grassi polinsaturi e componenti minori, come tocoferolo e composti fenolici (Owen et al., 2000a, 2000b). Questi ultimi agiscono come antiossidanti contro le specie reattive

dell'ossigeno (ROS), sono importanti dal punto di vista nutrizionale, incidono sulla qualità sensoriale e sulla conservabilità dell'olio grazie alla loro elevata stabilità ossidativa (Covas et al., 2009; Servili et al., 2009). La composizione chimica dell'olio di oliva è influenzata dalla cultivar, da fattori ambientali (condizioni climatiche e suolo), disponibilità idrica, luce solare, dal grado di maturazione delle olive e anche da fattori tecnologici (metodo applicato per l'estrazione) (Criado et al., 2004). I composti fenolici sono antiossidanti e scavenger di radicali liberi, capaci di proteggere l'olio dal processo di ossidazione e quindi dall'irrancidimento. Tale attività inibitoria sembra essere dovuta alla loro struttura chimica caratterizzata da un gruppo ossidrilico legato direttamente al carbonio di un anello benzenico (Fito Colomer, 2003). I fenoli sono estremamente rilevanti per la stabilità e le qualità nutrizionali, salutistiche e sensoriali che conferiscono al prodotto (Servili et al., 2009; Sánchez de Medina et al., 2013; Alu et al., 2017). Vari studi indicano che i fenoli presenti nell'olio extravergine di oliva forniscono benefici per la salute umana; presentano attività antinfiammatoria, antimicrobica, antitumorale e possono anche modulare l'espressione genica per proteggere le proteine che prendono parte ai meccanismi cellulari coinvolti nel processo infiammatorio, nella resistenza allo stress ossidativo e nel metabolismo lipidico (Covas et al., 2006; Konstantinidou et al., 2010). La stabilità ossidativa è un parametro centrale nella stima della qualità dell'olio di oliva, in quanto fornisce una valutazione affidabile della suscettibilità all'ossidazione, principale causa di alterazione per tale matrice (Velasco & Dobarganes, 2002). La shelf-life dell'olio di oliva è strettamente correlata al fenomeno dell'irrancidimento che deriva dal processo di autossidazione degli acidi grassi (Kristott, 2000). Questo fenomeno avviene in presenza di ossigeno generando composti instabili che possono modificare le caratteristiche organolettiche e nutrizionali dell'olio determinando così il deterioramento del prodotto. Sebbene sia inevitabile, il processo di ossidazione può essere ritardato per l'intervento di antiossidanti endogeni che migliorano la stabilità ossidativa prevenendo la propagazione della perossidazione lipidica o rimuovendo i radicali liberi. I composti fenolici svolgono un ruolo importante anche per quanto riguarda gli aspetti sensoriali tant'è che questi composti sono considerati quelli che influenzano maggiormente le caratteristiche gustative dell'olio di oliva. In particolare, questi composti sono associati agli attributi sensoriali amaro, astringente e pungente (Servili et al., 2004). Nello specifico diversi autori hanno suggerito che i derivati secoiridoidi di oleuropeina e demetiloleuropeina come 3,4-DHPEA e 3,4-DHPEA-EA sono i principali responsabili dell'amaro dell'olio di oliva (Kiritsakis, 1998; García et al., 2001). Per quanto riguarda l'aroma e il flavour, invece, sono stati identificati più di 180 composti volatili in grado di contribuire al profilo aromatico degli oli. Cultivar, regione geografica, maturazione dei frutti, metodi di lavorazione influenzano i composti volatili presenti nell'olio. Frutti di diverse cultivar coltivati nelle stesse condizioni ambientali producono oli con differenti composti volatili, così come frutti della stessa cultivar coltivati in diverse regioni geografiche (Sacchi et al., 1998; Angerosa et al., 1999; Prenzler et al., 2002; Ridolfi et al., 2002; Benincasa et al., 2003). È noto che i composti aromatici in un olio aumentano con il grado di maturazione dei frutti fino a raggiungere un contenuto massimo per poi decrescere (Aparicio & Morales, 1998; Kiritsakis, 1998b; Ranalli et al., 1998). Metodi e condizioni di estrazione, in particolare il tempo e la temperatura di gramolatura producono oli di oliva con aroma differente (Angerosa et al., 1998; Ranalli et al., 2001; Di Giovacchino et al., 2002; Ranalli et al., 2003).

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Determinazione fenoli totali

La metodica utilizzata per l'estrazione e la determinazione dei polifenoli totali è quella indicata da Favati et. al (1994). L'estrazione della componente fenolica totale dai campioni di olio è stata eseguita applicando il principio dell'estrazione in fase solida e utilizzano colonnine SPE C18 (GRACE da 6 mL) costituite da Ocatadecil-silano, che è l'adsorbente più utilizzato per le interazioni non polari. Il processo di estrazione consiste di quattro step consecutivi:

- Attivazione o condizionamento del materiale sorbente mediante eluizione di 10 mL di metanolo e 10 mL di esano;
- Caricamento del campione opportunamente disciolto in esano (1 g di olio in 10 mL di esano);
- Eluizione degli interferenti mediante eluizione con 15 mL di esano;
- Raccolta dei polifenoli trattenuti dalle colonnine mediante eluizione con 8 mL di metanolo.

Sull'estratto metanolico, portato al volume di 10 ml, è stata quindi determinata la concentrazione di fenoli totali applicando il metodo del Folin-Ciocalteu. A 2 mL dell'estratto metabolico sono aggiunti 5 mL di acqua distillata e successivamente 0,5 mL del reattivo Folin-Ciocalteu e, dopo 3 minuti, 4 mL di una soluzione di carbonato di sodio al 10%. La miscela, portata al volume di 20 mL con acqua distillata, viene quindi lasciata a riposo per 90 minuti. Trascorso il tempo necessario alla reazione, si procede con la filtrazione con filtri PTFE 0,45 µm ed infine con la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 765 nm. Il contenuto fenolico totale è espresso come mg di acido gallico equivalente per unità di peso del campione (mg GAE/g peso campione), calcolata sostituendo il valore di assorbanza determinato all'interno dell'equazione della retta di taratura costruita utilizzando soluzioni a concentrazione nota (tra 5 e 100 ppm) dello standard puro di Acido Gallico.

### 2.2. Determinazione dell'indice di amaro

La metodica seguita per la determinazione dell'indice di amaro è quella indicata da Gutiérrez-Rosales et al. (1992) che, al pari della determinazione dei polifenoli totali, prevede un'estrazione di tale componente mediante l'applicazione dell'estrazione di fase solida utilizzando anche in questo caso colonnine SPE C18 (GRACE da 6 mL).

- Attivazione o condizionamento del materiale sorbente mediante eluizione di 6 mL di Metanolo e 6 mL di esano;
- Caricamento del campione opportunamente disciolto in esano (1 g di olio in 4 mL di esano);
- Eluizione degli interferenti mediante eluizione con 10 mL di esano;
- Eluzione dei composti di interesse con 25 ml di una soluzione di acqua/metanolo 1:1 (v/v).

La determinazione dell'indice di amaro prevede quindi una lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di assorbimento dei composti coinvolti nel conferimento della nota di amaro (225 nm). L'indice di amaro IB viene calcolato utilizzando la seguente formula:

$$IB = 13,33 K_{225} - 0,837$$

### 2.3. Determinazione della stabilità ossidativa

La stabilità ossidativa è stata valutata mediante l'impiego del reattore Oxitest® (Velp Scientifica, Usmate, MB, Italy) (Fig. 1). 10 g di olio di oliva vengono posti nelle piastre porta campioni a loro volta inserite all'interno delle camere di reazione. Ogni corsa è effettuata con una pressione di ossigeno iniziale pari a 6 bar. Per la determinazione della shelf-life prevista ogni campione di olio è stato monitorato a 3 diverse temperature di incubazione: 90, 100 e 110 °C. Il risultato ottenuto viene espresso come tempo di induzione (IP) che rappresenta il tempo necessario per innescare l'ossidazione della matrice grassa. Il valore IP viene calcolato graficamente con l'ausilio del software di gestione dell'apparecchio OXISoft™ (Velp Scientifica). Viene registrata l'evoluzione della pressione di ossigeno all'interno della camera di reazione, la pressione decresce in maniera più o meno rapida all'insorgere dell'ossidazione. L'IP corrisponde al punto di intersezione tra la tangente alla curva che descrive l'ossidazione del campione e la retta secante nel punto di tangenza.

Utilizzando l'apposita funzione è poi possibile calcolare la shelf-life prevista caricando i dati degli IP rilevati alle tre diverse temperature di reazione.

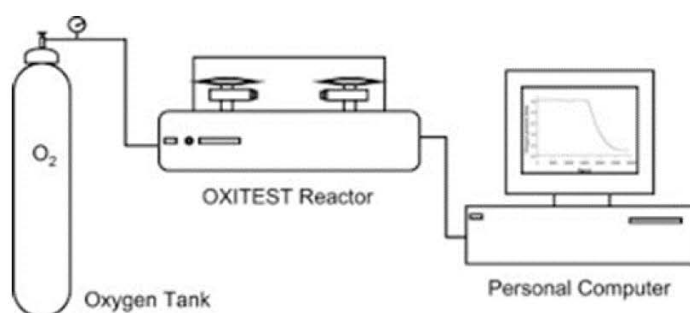


Fig. 1a



Fig. 1b

**Figura 1. Reattore Oxitest® a) schema strumentazione ; b) foto camera di reazione**

### 2.4. Analisi sensoriale

Allo scopo di delineare il profilo sensoriale dei campioni, è stata condotta un'analisi quantitativa descrittiva (QDA) che permette di identificare le sensazioni percepite e di quantificarne l'intensità.

Le sedute di analisi sono state condotte utilizzando un panel di 12 soggetti opportunamente selezionati e addestrati secondo le norme di riferimento. Per ogni campione sono stati valutati gli attributi dell'aspetto (colore giallo, colore verde e torbidità), dell'olfatto (pomodoro, carciofo, erba tagliata, fruttato, rancido, muffa morchia, off-odor) e del gusto/flavour (pomodoro, carciofo, erba tagliata, fruttato, off-flavour, amaro). Sono state valutate altresì le intensità degli attributi piccante e untuosità. Per la valutazione i campioni sono stati codificati con codici numerici a 3 cifre e sono stati presentati ai giudici secondo un ordine bilanciato e randomizzato. La randomizzazione, la codifica dei campioni e l'intera gestione del test sono state effettuate utilizzando FIZZ for Windows by Biosystèmes, un software specifico in dotazione al laboratorio di analisi sensoriale dell'Università

degli Studi della Basilicata. La valutazione dell'aspetto è avvenuta sotto luce bianca e in bicchieri trasparenti mentre tutti gli altri attributi sono stati valutati sotto luce rossa e in bicchieri di colore blu al fine di mascherare l'aspetto dei campioni. Nel corso di ogni sessione ai soggetti è stato chiesto di esprimere l'intensità degli attributi utilizzando una scala strutturata di 100 mm ancorata all'estremo sinistro a 0 (assenza della sensazione) e all'estremo destro a 100 (massima intensità della sensazione). Tra un campione e l'altro ai soggetti è stato chiesto di neutralizzare la bocca secondo una procedura consolidata che prevede il risciacquo della bocca alternato dal consumo di un pezzo di mela verde.



**Figura 2. Modalità di presentazione dei campioni di olio nelle sedute di analisi sensoriale**

### 3. Risultati e discussione

I risultati che verranno discussi nei prossimi paragrafi si riferiscono alle campagne 2020, 2021 e 2022 corrispondenti al secondo, al terzo e al quarto anno del progetto. Le variabili tecnologiche oggetto di valutazione sono riepilogate nella tabella 1.

Le variabili chimico fisiche sono state determinate sia al tempo zero, immediatamente dopo la separazione, che dopo 180 giorni. Le analisi sensoriali invece sono state condotte solo dopo 180 giorni. In questo capitolo verranno per tutti i parametri discussi i risultati ottenuti dalle analisi condotte dopo 180 giorni di maturazione.

**Tabella 1. – Variabili tecnologiche oggetto di valutazione per le diverse campagne olearie**

Campagna Olearia	Tipologie di Chiarificazione	Inoculo
2020	C – Chiarificazione controllo sotto flusso di aria A – Chiarificazione sotto flusso 100% Azoto B – Chiarificazione senza flusso di aria in centrifuga sigillata	I - <i>Lpb. pentosus</i> O17
2021 e 2022	C – Chiarificazione controllo sotto flusso di aria A – Chiarificazione sotto flusso 100% Azoto	I - <i>N. wicheramii</i> Y18

### 3.1. Campagna olearia 2020

Nella campagna olearia 2020, come riportato dalla tabella 1, il ceppo utilizzato per l'inoculo del mosto oleoso è *Lpb. pentosus* O17, un batterio lattico. Il ceppo è stato inoculato su una frazione pari al 50% del mosto oleoso a disposizione e la chiarificazione sia del mosto inoculato che di quello controllo è stata eseguita dopo una sedimentazione overnight nelle 3 condizioni riportate in tabella 1. L'analisi della varianza a due vie condotta ha evidenziato un effetto significativo delle due variabili tecnologiche (modalità di chiarificazione e inoculo) sulla stabilità ossidativa e sull'intensità di diversi attributi sensoriali (torbidità, pomodoro, carciofo, erba tagliata e piccante). Nessuna significatività è stata tuttavia evidenziata per la concentrazione dei fenoli totali e per l'indice di amaro.

Nello specifico i campioni ottenuti con le tecniche di chiarificazione sperimentali hanno fatto registrare valori di stabilità ossidativa, espressi come tempo di induzione, significativamente più bassi ( $p < 0,05$ ) rispetto ai campioni controllo. In merito agli attributi sensoriali, si rileva un appiattimento del flavour degli oli ottenuti con la chiarificazione senza flusso d'aria. Infatti si sono riscontrati valori significativamente inferiori ( $p < 0,05$ ) rispetto ai campioni controllo per gli attributi "pomodoro", "carciofo" ed "erba tagliata".

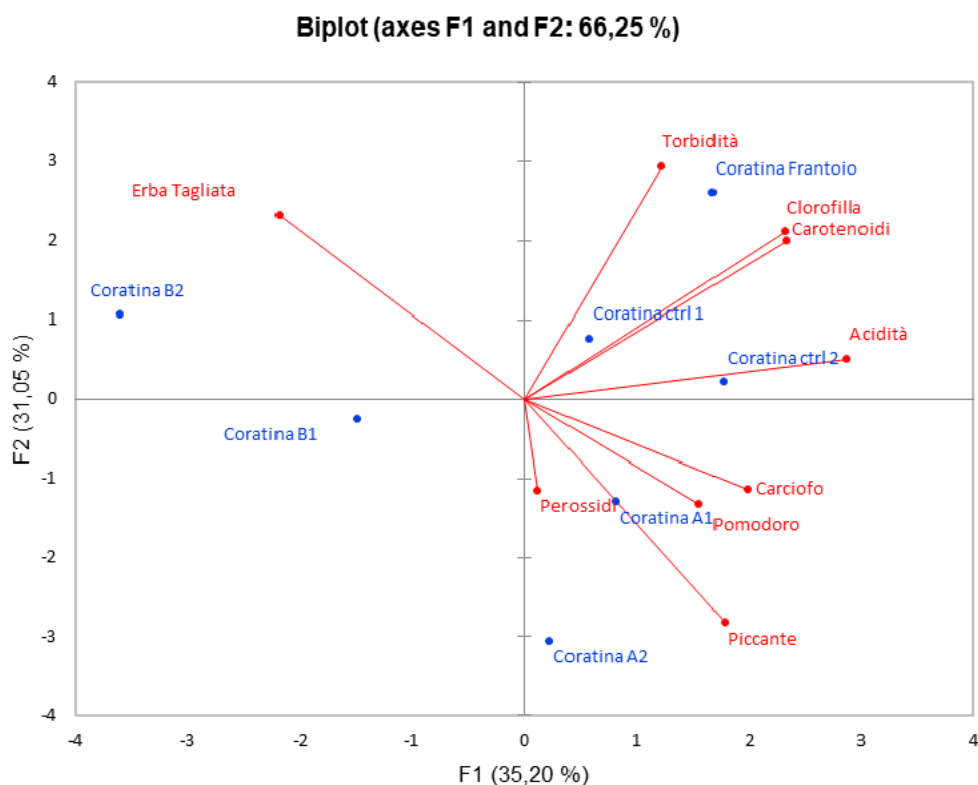
Per quanto riguarda l'effetto dell'inoculo, invece, innanzitutto va evidenziato che, nonostante l'olio rappresenti un substrato sfavorevole alla sopravvivenza e crescita microbica, diversi studi sono stati incentrati sull'uso di batteri lattici al fine di migliorare la qualità organolettica e nutrizionale ed incrementare la shelf-life dell'olio extravergine di oliva. In particolare, Kachouri & Hamdi (2006) e Sherahi et al. (2018) hanno evidenziato il miglioramento delle caratteristiche chimico-fisiche, organolettiche e nutrizionali dell'olio di oliva ottenuto da olive fermentate da *Lb. plantarum*.

**Tabella 2. Effetto dell'inoculo sulla stabilità ossidativa e sui parametri sensoriali**

Parametro	Inoculato	Non inoculato
Stabilità ossidativa	25,98 ± 3,5 <sup>b</sup>	28,68 ± 2,3 <sup>a</sup>
Torbidità	21,46 ± 20,4 <sup>a</sup>	11,02 ± 7,0 <sup>b</sup>
Pomodoro	18,92 ± 2,8 <sup>b</sup>	21,59 ± 5,2 <sup>a</sup>
Carciofo	21,78 ± 3,2 <sup>b</sup>	24,19 ± 4,1 <sup>a</sup>
Erba tagliata	12,64 ± 1,9 <sup>b</sup>	18,61 ± 7,1 <sup>a</sup>
Piccante	31,43 ± 10,6 <sup>b</sup>	38,41 ± 7,3 <sup>a</sup>

Al contrario, per i campioni oggetto di studio, ottenuti inoculando *Lb. plantarum* nel mosto oleoso, si registra un peggioramento significativo di tutti i parametri chimico-fisici e sensoriali (Tabella 2).

Utilizzando i dati di altre determinazioni analitiche quali l'acidità, il numero dei perossidi e la concentrazione di clorofilla e carotenoidi (dati non mostrati in questo capitolo) è stata condotta PCA allo scopo di aver un quadro riepilogativo sugli effetti delle variabili sperimentali. I risultati sono illustrati dalla figura 3.



**Figura 3. BiPlot relativo alla PCA condotta sui dati della campagna 2020**

La varianza spiegata dal modello è pari al 66,25%, Clorofilla e carotenoidi sono i parametri più correlati con la prima dimensione seguiti dalla torbidità. E' evidente come i campioni si separino in base alla tecnologia dimostrando un effetto significativo di quest'ultima sulle variabili chimico-fisiche e sensoriali valutate. In particolare i campioni ottenuti con la chiarificazione senza flusso d'aria con la centrifuga sigillata si differenziano fortemente dagli altri campioni che occupano lo spazio identificato dai quadranti collocati alla destra dell'intersezione degli assi.

I risultati illustrati in questo paragrafo, unitamente alle valutazioni fatte dagli altri gruppi di ricerca coinvolti illustrate negli altri capitoli di questo libro, hanno suggerito una modifica del piano sperimentale con la sostituzione della specie microbica utilizzata per l'inoculo del mosto oleoso sostituendo il batterio lattico *Lpb. pentosus* O17 con il lievito *N. wicheramii* Y18.

### **3.2. Campagne olearie 2021 e 2022**

Nelle campagne olearie 2021 e 2022, come riportato dalla tabella 1, il ceppo utilizzato per l'inoculo del mosto oleoso è *N. wicheramii* Y18, un lievito. Il ceppo è stato inoculato su una frazione pari al 50% del mosto oleoso a disposizione e la chiarificazione sia del mosto inoculato che di quello controllo è stata eseguita dopo una sedimentazione overnight nelle 2 condizioni riportate in tabella 1. L'analisi della varianza a due vie condotta ha evidenziato un effetto significativo delle due variabili tecnologiche (modalità di chiarificazione e inoculo) sulla stabilità ossidativa, sul contenuto di fenoli totali e sull'indice di amaro. Per quanto riguarda l'analisi sensoriale, i cui risultati sono riferiti solo alla campagna 2021, non sono state rilevate differenze significative per nessuno dei descrittori

dell'olfatto e del flavour. Le uniche differenze rilevate sono relative all'intensità del colore giallo e del colore verde con un effetto significativo del fattore "inoculo". Quanto riassunto verrà illustrato nel dettaglio nei prossimi paragrafi.

### 3.2.1. Fenoli totali

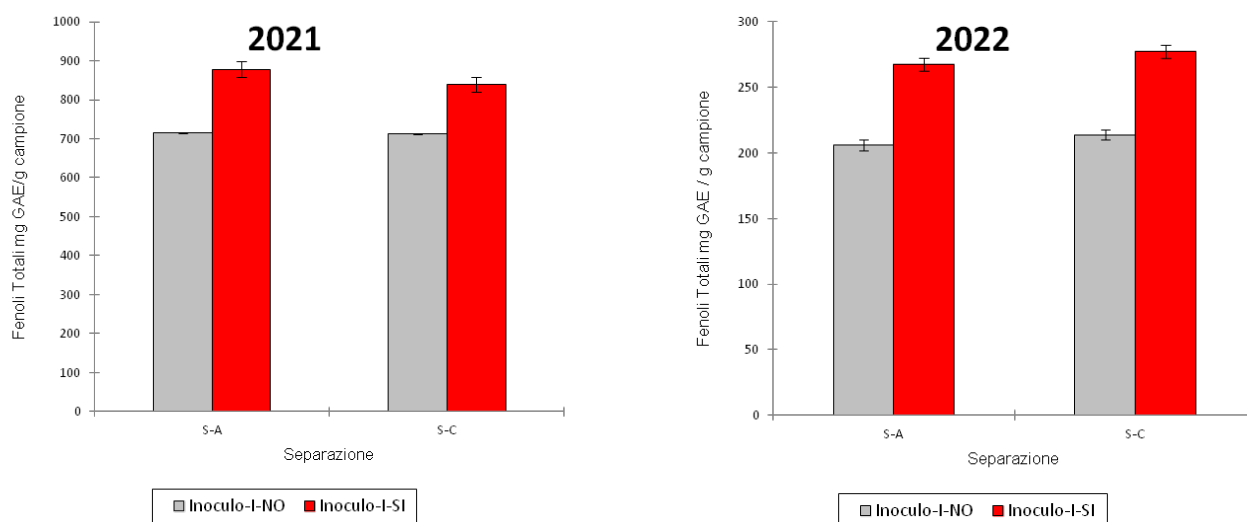
La tabella 3 riporta i risultati dell'analisi della varianza a due vie relativa alla concentrazione dei fenoli totali per ciascuna delle campagne olearie.

**Tabella 3. Risultati analisi della varianza per la variabile fenoli totali**

Campagna 2021				Campagna 2022			
Fattore	DF	F	p	Fattore	DF	F	p
Chiarificazione (C)	1	1.074	0.330	Chiarificazione (C)	1	16.81	0,070
Inoculo (I)	1	54.91	< 0.000	Inoculo (I)	1	821.3	< 0.000

Le modalità di chiarificazione non influenzano la concentrazione dei fenoli totali in nessuna delle due campagne olearie mentre l'inoculo del mosto oleoso con il ceppo di lievito *N. wicheramii* Y18 determina un aumento significativo della concentrazione sia per il 2021 che per il 2022.

I dati sono illustrati anche dai grafici riportati in figura 4.



**Figura 4. Concentrazione di Fenoli Totali per gli oli prodotti nelle campagne olearie 2021 e 2022**

La concentrazione dei fenoli totali degli oli 2022 è significativamente più bassa rispetto a quelli del 2021 ma questo è ascrivibile alla diversa qualità della materia prima che come è noto risente molto delle variabili pedoclimatiche. E' evidente però l'effetto dell'inoculo. L'aumento della concentrazione dei fenoli totali negli oli ottenuti dai mosti oleosi inoculati con *N. wicheramii* Y18 può essere spiegato dall'attività metabolica dei lieviti che agendo sui fenoli presenti nella miscela

acqua olio potrebbero averne modificato le caratteristiche aumentandone il grado di liposolubilità massimizzandone l'accumulo nella frazione oleosa e limitando le perdite di composti bioattivi nell'acqua separata durante la fase di chiarificazione.

### 3.2.2. Indice di amaro

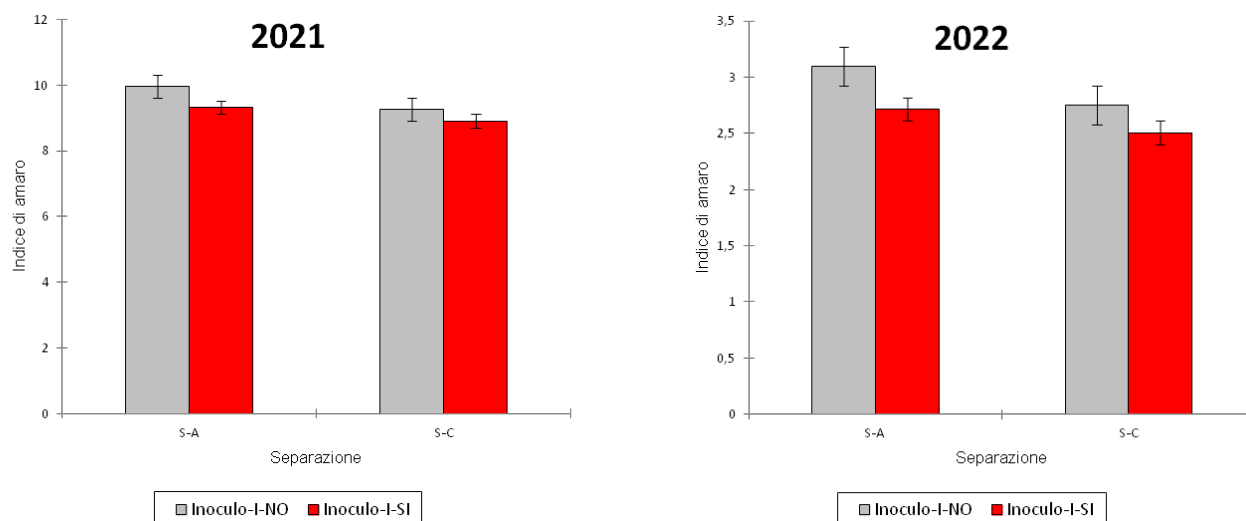
La tabella 4 riporta i risultati dell'analisi della varianza a due vie relativa alla concentrazione dei fenoli totali per ciascuna delle campagne olearie.

**Tabella 4. Risultati analisi della varianza per la variabile indice di amaro**

Campagna 2021				Campagna 2022			
Fattore	DF	F	p	Fattore	DF	F	p
Chiarificazione (C)	1	3.423	0.101	Chiarificazione (C)	1	43.53	< 0.000
Inoculo (I)	1	0.239	0.638	Inoculo (I)	1	2.645	0.123

Limitatamente alla campagna 2022 le modalità di chiarificazione sembrano influenzare significativamente il valore dell'indice di amaro che tuttavia presenta valori molto bassi e con differenze di piccola entità. In nessuna delle due campagne olearie invece è stato rilevato un effetto significativo dell'inoculo del mosto oleoso con il ceppo di lievito *N. wicheramii* Y18.

I dati sono illustrati anche dai grafici riportati in figura 5.



**Figura 5. Valori dell'indice di amaro per gli oli prodotti nelle campagne olearie 2021 e 2022**

Quanto illustrato dalla figura 5 consente di evidenziare un altro fattore. Pur non essendo stato rilevato un effetto significativo l'inoculo con il ceppo di lievito sembra avere un effetto sul valore dell'indice di amaro con una tendenza in diminuzione rispetto ai campioni omologhi prodotti dal mosto oleoso controllo. Questa osservazione conferma l'ipotesi avanzata in relazione ai fenoli

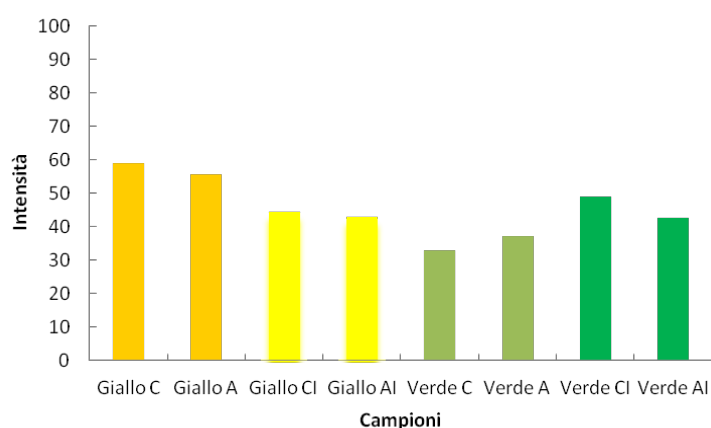
totali che considera un possibile effetto di *N. wicheramii* Y18 sulle caratteristiche del patrimonio fenolico.

### 3.2.3. *Attributi sensoriali*

L'analisi della varianza condotta sui valori di intensità degli attributi sensoriali misurati dal panel di soggetti addestrati ha evidenziato un effetto significativo del fattore campione ( $p < 0.05$ ) limitatamente agli attributi dell'aspetto in termini di intensità del colore verde e del colore giallo. Il test della minima distanza significativa (LSD95%) ha evidenziato differenze fra i campioni di olio in relazione all'inoculo. I campioni di olio prodotti a partire dal mosto oleoso inoculato con il lievito *N. wicheramii* Y18 risultano caratterizzati da un maggiore equilibrio fra l'intensità del giallo e del verde mentre i campioni di olio prodotti dal mosto controllo presentano una nota gialla predominante e l'intensità del verde significativamente più bassa (Tabella 5 ; Figura 6).

**Tabella 5. Intensità del giallo e del verde per gli oli prodotti nella campagna 2021**

Campione	Colore Giallo	Colore Verde
C – Chiarificazione Controllo	59.00 <sup>a</sup>	32.93 <sup>b</sup>
A – Chiarificazione sotto Azoto	55.60 <sup>a</sup>	37.07 <sup>b</sup>
CI – Chiarificazione Controllo mosto inoculato	44.40 <sup>b</sup>	48.83 <sup>a</sup>
AI – Chiarificazione sotto Azoto mosto inoculato	42.80 <sup>b</sup>	42.63 <sup>a</sup>



**Figura 6. Intensità del giallo e del verde per gli oli prodotti nella campagna olearia 2021**

### 3.2.4. *Stabilità ossidativa*

La stima della stabilità ossidativa è stata effettuata utilizzando uno strumento dedicato OXITEST prodotto dalla VELP. Lo strumento calcola il tempo di induzione (avvio dell'ossidazione) monitorando la pressione di ossigeno all'interno delle camere di analisi. Tutti gli oli della campagna

2021 sono stati sottoposti a tre cicli di valutazione della stabilità ossidativa che hanno permesso di calcolare i tempi di induzione (IP) a 90°C, 100°C e 110°C. Con un particolare software dedicato è stato possibile altresì stimare la shelf-life degli oli relazionando i dati di IP ottenuti alle diverse temperature di prova. La tabella 6 riporta i dati del tempo di induzione a 90°C e della stima della shelf life per ognuno degli oli sperimentali. E' evidente la significatività di entrambi i fattori ( $p < 0.05$ ). La chiarificazione sotto flusso di azoto influenza negativamente il tempo di induzione. Gli oli così prodotti risultano meno stabili e con una più bassa shelf life rispetto ai campioni chiarificati con la tecnologia tradizionale sotto flusso di aria. Particolarmente interessante il dato che vede gli oli inoculati con il lievito essere caratterizzati da una maggiore stabilità ossidativa. E' probabile che i lieviti riescano a degradare i fenoli complessi in altri fenoli caratterizzati da un maggiore potere antiossidante. Questa ipotesi, però, andrebbe validata con l'acquisizione e lo studio del profilo fenolico degli oli i cui risultati sono in fase di elaborazione.

**Tabella 6. Tempo di induzione a 90 °C (IP) e Shelf Life (SF) stimata per gli oli 2021**

<b>Campione</b>	<b>IP 90 °C</b>	<b>SF (anni)</b>
C – Chiarificazione Controllo	168.66 <sup>b</sup>	6.73
A – Chiarificazione sotto Azoto	146.43 <sup>d</sup>	5.52
CI – Chiarificazione Controllo mosto inoculato	171.01 <sup>a</sup>	9.23
AI – Chiarificazione sotto Azoto mosto inoculato	152.94 <sup>c</sup>	7.63

#### 4. Bibliografia

- [1] Alu, M.H.; Rababah, T.; Alhamad, M. N. (2017). Application of Olive Oil as Nutraceutical and Pharmaceutical Food: Composition and Biofunctional Constituents and Their Roles in Functionality, Therapeutic, and Nutraceutical Properties. Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands,.
- [2] Angerosa, F., D\_alexandro, N., Basti, C., & Vito, R. (1998). Biogeneration of volatile compounds in virgin olive oil: their evolution in relation to malaxation time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2940–2944.
- [3] Angerosa F., Lanza B., Marsilio V., C. S. (1999). Olive oil off odour compounds produced by *Aspergillus* and *Penicillium*. *Acta Horticult*, 74, 695–699.
- [4] Aparicio, R., & Morales, M. T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1116–1122.
- [5] Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2003). Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 733–741.
- [6] Covas, M. I., Konstantinidou, V., & Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 477–482. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181c5e7fd>
- [7] Covas, M. I., Ruiz-Gutiérrez, V., De La Torre, R., Kafatos, A., Lamuela-Raventós, R. M., Osada, J., Owen, R. W., & Visioli, F. (2006). Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews*, 64(10 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1301/nr.2006.oct.S20-S30>

- [8] Criado, M. N., Morelló, J. R., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7), 633–640. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-954-z>
- [9] D'Alessandro, A., & Pergola, G. De. (2015). Mediterranean diet and cardiovascular disease: A critical evaluation of a priori dietary indexes. *Nutrients*, 7(9), 7863–7888. <https://doi.org/10.3390/nu7095367>
- [10] Di Giovacchino, L., Sestili, S., & Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9), 587–601.
- [11] Fito Colomer, M. (2003). Efectos Antioxidantes del Aceite de Oliva y de Sus Compuestos Fenólicos.
- [12] García, J. M., Yousfi, K., Mateos, R. (2001). Reduction of bitterness by heating of olive (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4231–4235.
- [13] Kiritsakis, A. K. (1998a). Flavor components of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 673–681.
- [14] Kiritsakis, A. K. (1998b). Flavor components of olive oil - a review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(6), 673–681.
- [15] Konstantinidou, V., Covas, M.I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., del Carmen Tormos, M., Toledo, E., Marti, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Ruiz Mendez, M.V., Fito, M. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *Faseb Journal*, 24(7), 2546–2457.
- [16] Kristott, J. (2000). Fats and oils. Stability and Shelf Life of Food.
- [17] Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), 647–659.
- [18] Prenzler, P. D., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Robards, K. (2002). Volatile profile of olive oils. *Advances in Horticultural Science*, 16(3–4), 246–252.
- [19] Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., & Simone, N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(4), 228–238.
- [20] Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., & Lucera, L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(2), 57–67.
- [21] Ranalli, A., Tombesi, A., Ferrante, M. L., & De Mattia, G. (1998). Respiratory rate of olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 77(3), 359–367.
- [22] Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M., & Fontanazza, G. (2002). Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 835–839.
- [23] Sacchi, R., Mannina, L., Fiordiponti, P., Barone, P., Paolillo, L., Patumi, M. (1998). Characterization of Italian extra virgin olive oils using H-1-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 3947–3951.
- [24] Sánchez de Medina, V., Riachy, M. El, Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2013). Mass spectrometry to evaluate the effect of the ripening process on phenols of virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(9), 1053–1061. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300059>
- [25] Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography*, 1054(1–2), 113–127.
- [26] Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F.,
- [27] Soler-Rivas C., Epsin J. C., W. H. J. (. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1013–1023.

- [28] Solfrizzi, V., Panza, F., Frisardi, V., Seripa, D., Logroscino, G., Imbimbo, B. P., &
- [29] Tripoli, E., La Guardia, M., Di Majo, D., Giammanco, S., & Giammanco, M. (2009). Composition and Nutritional properties of Mediterranean extra-virgin olive oils. *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale*, 82(1). <https://doi.org/10.4081/4731>
- [30] Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 661–676. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-Doxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. Atherosclerosis, 117\(1\), 25–32.](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-Doxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. Atherosclerosis, 117(1), 25–32.)
- [31] Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E. D. (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(6), 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.6.1402S>



---

# Effect of innovative extraction techniques on the quality, oxidative stability, and organoleptic properties of extra virgin olive oils

---

*Nicola Condelli\*, Maria Di Cairano, Teresa Scarpa, Fernanda Galgano*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

## *Summary*

The chemical composition of olive oil and, consequently, its sensory and nutritional quality is influenced by various factors, including technological ones. Among the various compounds, phenols play a fundamental role as they are responsible for the intensity of some sensory drivers such as bitterness and pungency, and oxidative stability in relation to their antioxidant characteristics.

This work focuses on providing indications on the effect of clarification methods and inoculation of oily must with microorganisms on the quality, oxidative stability, and organoleptic characteristics of extra virgin olive oils.

The experimental samples were characterized from a sensorial point of view, and for their content of total polyphenols, their bitterness index, and oxidative stability.

The inoculation of the oily must with the yeast *N. wicheramii* Y18 significantly influenced the quality of the oils produced, providing oils with a higher content of total phenols and better oxidative stability together with a more balanced color with more intense green notes.

**Keywords:** extra virgin olive oil; phenols; oxidative stability

## **1. Introduction**

Extra virgin olive oil is universally recognized as a symbol of the Mediterranean diet (Willett et al., 1995). Several studies showed a strong relationship between adherence to this nutritional model and a lower incidence of obesity, atherosclerosis, hypertension, diabetes, cardiovascular, neurodegenerative, and other chronic and metabolic diseases (Solfrizzi et al., 2011; D'Alessandro & Pergola, 2015).

The healthy properties of olive oil are associated with the presence of monounsaturated fatty acids (MUFA), in particular, oleic acid, which represents almost 80% of the total lipid component (Tripoli et al., 2009), a balanced presence of polyunsaturated fatty acids, and minor components, such as tocopherol and phenolic compounds (Owen et al., 2000a, 2000b). The latter

act as antioxidants against reactive oxygen species (ROS), they are important from a nutritional point of view and affect the sensory quality and shelf life of the oil thanks to their high oxidative stability (Covas et al., 2009; Servili et al. al., 2009).

The chemical composition of olive oil is influenced by the cultivar, the soil and climatic conditions, water availability, sunlight, the degree of ripeness of the olives, and also by technological factors such as the extraction method applied (Criado et al., 2004). Phenolic compounds are antioxidants and scavengers of free radicals, able to protect the oil from the oxidation process and consequently from the rancidity. This inhibitory activity seems to be due to their chemical structure characterized by a hydroxyl group linked directly to the carbon of a benzene ring (Fito Colomer, 2003). Phenols are extremely relevant for the stability, and the nutritional, healthy, and sensory qualities they confer on the product (Servili et al., 2009; Sánchez de Medina et al., 2013; Alu et al., 2017). Different studies indicated that the phenols present in extra virgin olive oil provide benefits for human health; they exhibit anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer activities. In addition, they can also modulate gene expression to protect proteins that take part in cellular mechanisms involved in the inflammatory process, resistance to oxidative stress, and lipid metabolism (Covas et al., 2006; Konstantinidou et al. , 2010). Oxidative stability is a central parameter in the estimation of olive oil quality, as it provides a reliable assessment of the susceptibility to oxidation, the main cause of alteration for this matrix (Velasco & Dobarganes, 2002). The shelf life of olive oil is closely related to the phenomenon of rancidity resulting from the autoxidation process of fatty acids (Kristott, 2000).

Autoxidation occurs in presence of oxygen and generates unstable compounds that can modify the organoleptic and nutritional characteristics of the oil, thus determining the deterioration of the oil. Although it is inevitable, the oxidation process can be delayed by the intervention of endogenous antioxidants that improve oxidative stability by preventing the propagation of lipid peroxidation or by scavenging free radicals. Phenolic compounds also play an important role in sensory aspects. They are considered the compounds that most influence the taste characteristics of olive oil. In particular, these compounds are associated with the sensory attributes bitter, astringent and pungent (Servili et al., 2004).

Specifically, several authors suggested that the secoiridoid derivatives of oleuropein and demethyloleuropein such as 3,4-DHPEA and 3,4-DHPEA-EA are mainly responsible for olive oil bitterness (Kiritsakis, 1998; García et al., 2001). In respect of aroma and flavor, more than 180 volatile compounds that can contribute to the aromatic profile of oils have been identified. Cultivars, geographical regions, fruit ripening, and processing methods influence the volatile compounds of the oil. Fruits of different cultivars grown in the same environmental conditions produce oils with different volatile compounds, as fruits of the same cultivar grown in different geographical regions (Sacchi et al., 1998; Angerosa et al., 1999; Prenzler et al., 2002; Ridolfi et al., 2002; Benincasa et al., 2003). It is known that the aromatic compounds in an oil increase with the degree of ripening of the fruit until they reach a maximum content and then decrease (Aparicio & Morales, 1998; Kiritsakis, 1998b; Ranalli et al., 1998). Extraction methods and conditions, in particular kneading time and temperature, produce olive oils with different aromas (Angerosa et al., 1998; Ranalli et al., 2001; Di Giovacchino et al., 2002; Ranalli et al., 2003).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Total phenolic compounds

The method used for the extraction and determination of total polyphenols was that indicated by Favati et. al (1994). The extraction of the total phenolic component from the oil samples was performed by applying the principle of solid phase extraction and using C18 SPE columns (6 mL GRACE) consisting of Octadecyl-silane, which is the most used sorbent for the non-polar interactions. The extraction process consisted of four steps:

- Activation or conditioning of the sorbent material by elution of 10 mL of methanol and 10 mL of hexane;
- Loading of the sample suitably dissolved in hexane (1 g of oil in 10 mL of hexane);
- Elution of the interfering compounds by elution with 15 mL of hexane;
- Collection of the polyphenols retained by the columns by elution with 8 mL of methanol.

Then, the concentration of total phenols was determined by applying the Folin-Ciocalteu method on the methanolic extract, brought up to a total volume of 10 mL. Five mL of distilled water was added to 2 mL of the diluted methanolic extract. After 3 minutes, 0.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent was added and then 4 mL of a 10% sodium carbonate solution. The mixture brought up to a volume of 20 mL with distilled water, was then left to rest for 90 minutes. Then, filtration is carried out with 0.45 µm PTFE filters. Finally, samples were read at a wavelength of 765 nm. The total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalent per unit weight of the sample (mg GAE/g sample weight). The concentration of GAE was calculated by using an external standard curve in the range of 5-100 ppm.

### 2.2. Bitterness index

The method followed for the determination of the bitterness index (BI) was that reported in Gutiérrez-Rosales et al. (1992). The method involves the application of solid phase extraction using C18 SPE columns (6 mL GRACE):

- Activation or conditioning of the sorbent material by elution of 6 mL of Methanol and 6 mL of hexane;
- Loading of the sample suitably dissolved in hexane (1 g of oil in 4 mL of hexane);
- Elution of the interfering compounds by elution with 10 mL of hexane;
- Elution of the compounds of interest with 25 mL of a 1:1 (v/v) water/methanol solution.

The determination of the BI requires a spectrophotometric reading at the absorption wavelength of the compounds involved in conferring the bitterness note (225 nm). The bitterness index IB is calculated using the following formula:

$$IB = 13,33 K_{225} - 0,837$$

### 2.3. Oxidative stability

Oxidative stability was evaluated using the Oxitest<sup>®</sup> reactor (Velp Scientifica, Usmate, MB, Italy) (Fig. 1). Ten g of olive oil was placed in each of the three sample holders which were in turn

inserted inside the reaction chambers. Each test was performed with an initial oxygen pressure of 6 bar. To determine the expected shelf life, each oil sample was monitored at three different incubation temperatures: 90, 100, and 110°C. The result obtained is expressed as induction period (IP) which represents the time necessary to trigger the oxidation of the fat matrix. The IP value was calculated graphically with the device management software OXISoft™ (Velp Scientifica). The evolution of the oxygen pressure inside the reaction chamber is recorded, the pressure decreases more or less rapidly with the onset of oxidation. The IP corresponds to the point of intersection between the tangent to the curve describing the oxidation of the sample and the secant line at the point of tangency.

Then using the appropriate function it is then possible to calculate the expected shelf life by loading the IP data detected at the three different reaction temperatures.

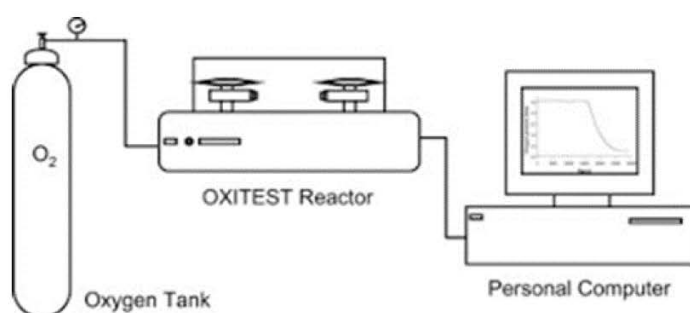


Fig. 1a



Fig. 1b

**Figure 1. Oxitest® reactor a) schematic representation of the equipment; b) picture of the reaction chamber**

## 2.4 Sensory analysis

A quantitative descriptive analysis (QDA), which allows the identification of the sensations perceived and the quantification of their intensity, was carried out to outline the sensory profile of the samples.

The sensory sessions were conducted using a panel of 12 subjects suitably selected and trained according to the reference standards.

For each sample, the attributes of appearance (yellow color, green color, and turbidity), and smell (tomato, artichoke, cut grass, fruity, rancid, sludge, mold, off-odor) were evaluated and taste/flavour (tomato, artichoke, cut grass, fruity, off-flavour, bitter). The intensities of the pungency and greasiness attributes were also evaluated.

For the evaluation, the samples were coded with 3-digit numerical codes and presented to the judges in a balanced and randomized order. Randomization, coding of the samples, and the management of the test were carried out using FIZZ for Windows by Biosystèmes.

The evaluation of the appearance took place under white light and in transparent glasses while all other attributes were evaluated under red light and in blue-colored glasses to mask the appearance of the samples.

During each session, subjects were asked to rate the intensity of the attributes using a structured 100 mm scale anchored at the left end at 0 (absence of sensation) and the right end at 100 (maximum sensation intensity). Between each sample, subjects were asked to neutralize their mouth according to an established procedure that involves rinsing the mouth alternately with consuming a piece of green apple.



**Figure 2. Presentation of oil samples during sensory analysis sessions**

### 3. Results and discussions

The results reported below refer to 2020, 2021, and 2022 olive oil campaigns, which correspond to the second, third, and fourth years of the project, respectively. The technological variables being evaluated are summarized in table 1.

The chemical-physical variables were determined both at time zero, immediately after separation, and after 180 days. The sensory analyzes were conducted only after 180 days. The results obtained from the analyzes conducted after 180 days of maturation for all the parameters will be discussed in this chapter.

**Table 1. Technological variables evaluated for the different olive oil campaigns**

Olive oil campaign	Clarification systems	Inoculum
2020	C – Control clarification under air flow A – Clarification under 100% nitrogen flow B – Clarification without air flow in a sealed centrifuge	<i>Lpb. pentosus</i> O17
2021 e 2022	C – Control clarification under air flow A – Clarification under 100% nitrogen flow	<i>N. wicheramii</i> Y18

#### 3.1. Olive oil campaign 2020

In the 2020 oil campaign, as shown in table 1, the strain used for the inoculation of the oily must was *Lpb. pentosus* O17, a lactic acid bacterium. The strain was inoculated on a fraction equal to 50% of the oily must available and the clarification of both the inoculated and the control must

was performed after overnight sedimentation in the 3 conditions reported in table 1. Two-way ANOVA highlighted a significant effect of the two technological variables (clarification method and inoculum) on the oxidative stability and the intensity of different sensory attributes (turbidity, tomato, artichoke, cut grass, and pungency). However, no significant differences were highlighted for the concentration of total phenols and the bitterness index.

Specifically, the samples obtained with the experimental clarification techniques had significantly lower ( $p < 0.05$ ) IP values compared to the control samples. Concerning the sensory attributes, there is a flattening of the flavor of the oils obtained with clarification without air flow. Significantly lower values ( $p < 0.05$ ) were found for the attributes "tomato", "artichoke" and "cut grass" when compared to control samples.

Regarding the effect of the inoculum, although the oil represents an unfavorable substrate for microbial survival and growth, several studies focused on the use of lactic acid bacteria to improve the organoleptic quality, nutritional properties, and shelf life of extra virgin olive oil. In particular, Kachouri & Hamdi (2006) and Sherahi et al. (2018) highlighted the improvement of the chemical-physical, organoleptic and nutritional characteristics of the olive oil obtained from olives fermented by *Lb. plantarum*. On the contrary, the samples of this work, obtained by inoculating *Lb. plantarum* in the oily must, showed a significant worsening of all the chemical-physical and sensory parameters (Table 2).

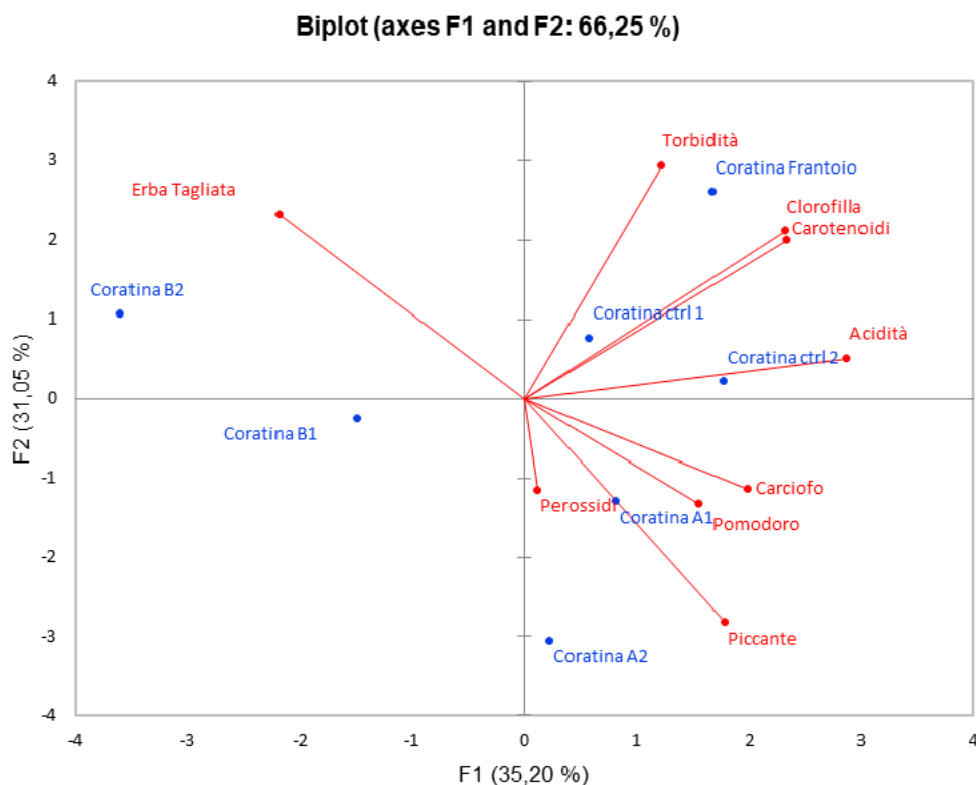
**Table 2. Effect of the inoculum on the oxidative stability and sensory properties of olive oil**

Parameters	Inoculated	Not inoculated
Oxidative stability	25.98 ± 3.5 <sup>b</sup>	28.68 ± 2.3 <sup>a</sup>
Turbidity	21.46 ± 20.4 <sup>a</sup>	11.02 ± 7.0 <sup>b</sup>
Tomato	18.92 ± 2.8 <sup>b</sup>	21.59 ± 5.2 <sup>a</sup>
Artichoke	21.78 ± 3.2 <sup>b</sup>	24.19 ± 4.1 <sup>a</sup>
Cut grass	12.64 ± 1.9 <sup>b</sup>	18.61 ± 7.1 <sup>a</sup>
Pungency	31.43 ± 10.6 <sup>b</sup>	38.41 ± 7.3 <sup>a</sup>

Using the data of the other analytical determinations such as acidity, the peroxide number, and the concentration of chlorophyll and carotenoids (data not shown in this chapter) PCA was conducted to summarize the effects of the experimental variables. The results are illustrated in Figure 3.

The variance explained by the model is 66.25%, Chlorophyll and carotenoids are parameters most correlated with the first dimension, followed by turbidity. The samples are separated according to the technology, this demonstrates its significant effect on the chemical-physical and sensory variables evaluated. In particular, the samples obtained with the clarification without airflow with the sealed centrifuge strongly differ from the other samples that occupy the space identified by the quadrants placed to the right of the intersection of the axes.

The results illustrated in this paragraph, together with the evaluations made by the other research groups involved in the project, and illustrated in the other chapters of this book, suggested a modification of the experimental plan. Hence, *Lpb. pentosus* O17 used for the inoculation of the oily must was substituted with the yeast *N. wicheramii* Y18 in the following campaigns.



**Figure 3. PCA Biplot of the data from the 2020 olive oil campaign**

### 3.2. Olive oil campaigns 2021-2022

In the 2021 and 2022 oil campaigns, as shown in table 1, the strain used for the inoculation of the oily must was the yeast *N. wicheramii* Y18. The strain was inoculated on on half of the oily must available and the clarification of both the inoculated and the control must was performed after overnight sedimentation in the 2 conditions shown in table 1. The two-way ANOVA showed a significant effect of the two technological variables (clarification method and inoculum) on the oxidative stability, on the total phenol content and on the bitterness index. As regards the sensory analysis, the results reported refer only to the 2021 campaign, no significant differences were found for any of the smell and flavor descriptors. The only differences found are related to the intensity of yellow and green color with a significant effect of the "inoculum" factor.

#### 3.2.1. Total phenols

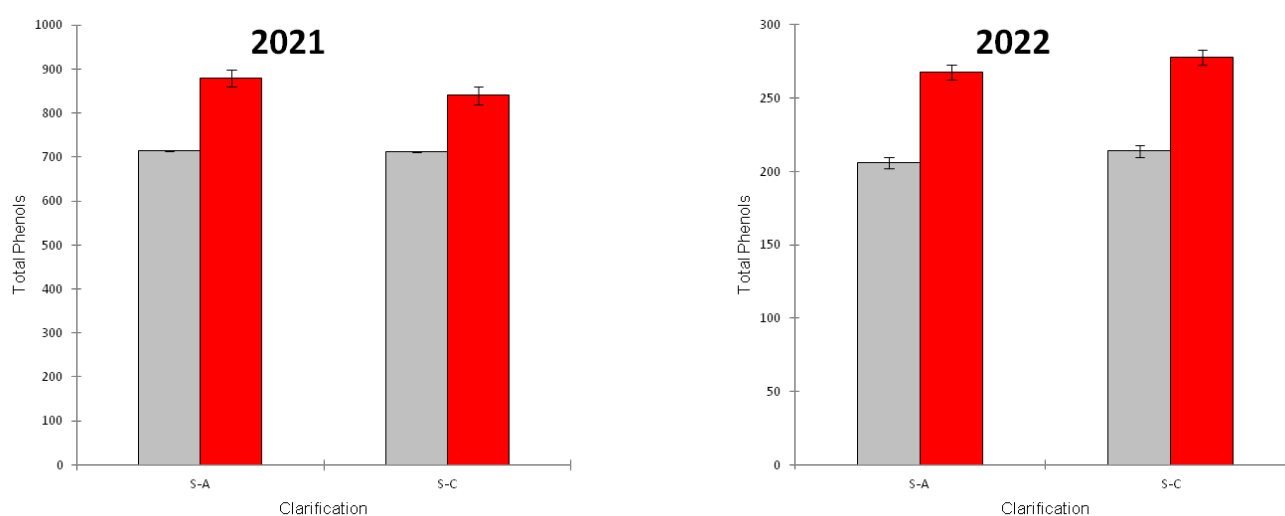
Table 3 reports the results of the two-way ANOVA relating to the concentration of total phenols for both the olive oil campaigns.

The clarification methods did not influence the concentration of total phenols in either of the two oil campaigns, while the inoculation of the oily must with the yeast strain *N. wicheramii* Y18 caused a significant increase in the concentration for both 2021 and 2022 oils.

The data is illustrated by the graphs shown in Figure 4.

**Table 3. Results of the analysis of variance for total phenols variable**

Campaign 2021				Campaign 2022			
Factor	DF	F	<i>p</i>	Factor	DF	F	<i>p</i>
Clarification (C)	1	1.074	0.330	Clarification (C)	1	16.81	0,070
Inoculum (I)	1	54.91	< 0.000	Inoculum (I)	1	821.3	< 0.000



**Figure 4. Total phenols concentration for the oils without (grey) and with (red) inoculation**

The concentration of total phenols in the 2022 oils was significantly lower than that of the 2021 oils; this was due to the different quality of the raw material which is greatly affected by the pedoclimatic conditions. However, the effect of the inoculum was evident. The increase in the concentration of total phenols in the oils obtained from oily musts inoculated with *N. wicheramii* Y18 can be explained by the metabolic activity of the yeasts. Indeed, by acting on the phenols present in the water-oil mixture, could have modified its characteristics by increasing the degree of fat solubility, maximizing its accumulation in the oil fraction, and limiting the losses of bioactive compounds in the separated water during the clarification phase.

### 3.2.2. Bitterness index

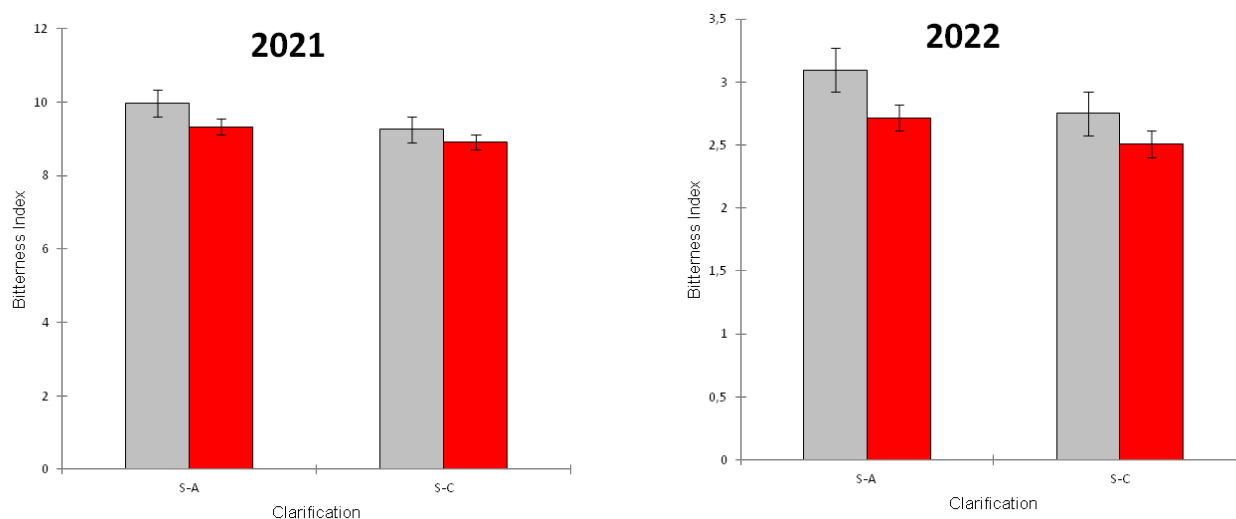
Table 4 reports the results of the two-way analysis of variance relating to the concentration of total phenols for each of the olive oil campaigns.

The clarification methods seem to significantly influence the value of the bitterness index only for the 2022 campaign. However, it had very low values and small differences. On the other hand, the effect of the inoculation of the oily must with *N. wicheramii* Y18 was not significant in either the two oil campaigns. The data is illustrated by the graphs shown in Figure 5.

Although a significant effect was not detected, from figure 5 it is possible to highlight that the inoculum with the yeast strain seems to reduce the bitterness index of the oils when compared to the control. This observation could confirm the hypothesis of a possible effect of *N. wicheramii* Y18 on the characteristics of the phenolic compounds.

**Table 4. Results of the analysis of variance for bitterness index variable**

Campagna 2021				Campagna 2022			
Fattore	DF	F	<i>p</i>	Fattore	DF	F	<i>p</i>
Chiarificazione (C)	1	3.423	0.101	Chiarificazione (C)	1	43.53	< 0.000
Inoculo (I)	1	0.239	0.638	Inoculo (I)	1	2.645	0.123



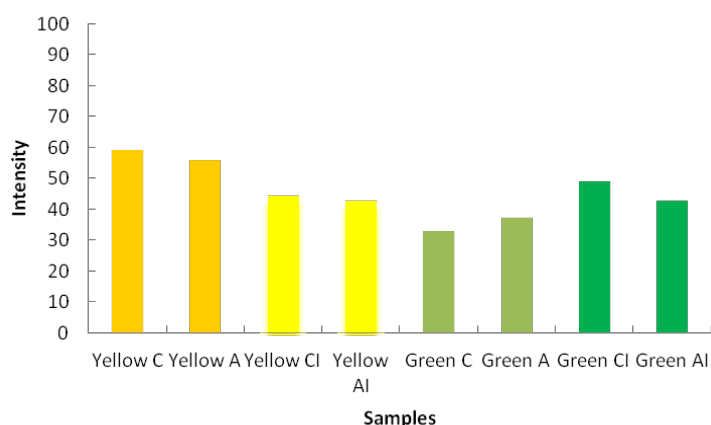
**Figure 5. Bitterness index values for the oils without (grey) and with (red) inoculation**

### 3.2.3. Sensory attributes

The analysis of the variance carried out on the intensity values of the sensory attributes measured by the panel of trained subjects showed a significant effect of the sample factor ( $p < 0.05$ ) limited to the attributes of appearance in terms of intensity of the green and yellow colors. The least significant distance test (LSD 95%) showed differences between the oil samples in relation to the inoculum. The oil samples produced starting from the oily must inoculated with the yeast *N. wicheramii* Y18 were characterized by a greater balance between the intensity of yellow and green, whereas the oil samples produced from the control must show a predominant yellow note and the significantly lower green intensity (Table 5; Figure 6).

**Table 5. The yellow and green intensity of the oils produced in 2021 campaign**

Sample	Yellow color	Green color
C – Control clarification	59.00 <sup>a</sup>	32.93 <sup>b</sup>
A – Clarification under nitrogen flow	55.60 <sup>a</sup>	37.07 <sup>b</sup>
CI – Control clarification of inoculated oily must	44.40 <sup>b</sup>	48.83 <sup>a</sup>
AI – Clarification under nitrogen flow of inoculated oily must	42.80 <sup>b</sup>	42.63 <sup>a</sup>

**Figure 6. The yellow and green intensity of the oils produced in 2021 campaign**

### 3.2.4. Oxidative stability

The estimation of the oxidative stability was carried out using a dedicated instrument, OXITEST, produced by VELP Scientifica. The instrument calculates the induction period (IP), which is the initiation of oxidation, by monitoring the oxygen pressure inside the analysis chambers. All the oils of the 2021 campaign were subjected to three cycles of oxidative stability evaluation which made it possible to calculate the IPs at 90°C, 100°C, and 110°C. Through the dedicated software, OxiSoft, the shelf life of the oils was estimated by relating the IP data obtained at the different test temperatures. Table 6 reports IP values at 90°C and the estimated shelf life for each of the experimental oils. Both factors are significant ( $p < 0.05$ ). Clarification under nitrogen flow adversely affects the induction time. Thus, the oils produced are less stable and with a shorter shelf life than the samples clarified with traditional technology under air flow. Particularly interesting is that oils inoculated with yeast are characterized by greater oxidative stability. Yeasts are probably able to degrade complex phenols into other phenols characterized by a greater antioxidant power. This hypothesis, however, should be validated with the acquisition and evaluation of the phenolic profile of the oils whose results are being processed.

**Table 6. Induction Period at 90 °C (IP) and Shelf Life (SL) for 2021 oils**

<b>Campione</b>	<b>IP 90 °C</b>	<b>SL (years)</b>
C – Control clarification	168.66 <sup>b</sup>	6.73
A – Clarification under nitrogen flow	146.43 <sup>d</sup>	5.52
CI – Control clarification of inoculated oily must	171.01 <sup>a</sup>	9.23
AI – Clarification under nitrogen flow of inoculated oily must	152.94 <sup>c</sup>	7.63

#### 4. References

- [1] Alu, M.H.; Rababah, T.; Alhamad, M. N. (2017). Application of Olive Oil as Nutraceutical and Pharmaceutical Food: Composition and Biofunctional Constituents and Their Roles in Functionality, Therapeutic, and Nutraceutical Properties. Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands,.
- [2] Angerosa, F., D\_alessandro, N., Basti, C., & Vito, R. (1998). Biogenesis of volatile compounds in virgin olive oil: their evolution in relation to malaxation time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2940–2944.
- [3] Angerosa F., Lanza B., Marsilio V., C. S. (1999). Olive oil off odour compounds produced by *Aspergillus* and *Penicillium*. *Acta Horticult*, 74, 695–699.
- [4] Aparicio, R., & Morales, M. T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1116–1122.
- [5] Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2003). Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 733–741.
- [6] Covas, M. I., Konstantinidou, V., & Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 477–482. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181c5e7fd>
- [7] Covas, M. I., Ruiz-Gutiérrez, V., De La Torre, R., Kafatos, A., Lamuela-Raventós, R. M., Osada, J., Owen, R. W., & Visioli, F. (2006). Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews*, 64(10 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1301/nr.2006.oct.S20-S30>
- [8] Criado, M. N., Morelló, J. R., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7), 633–640. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-954-z>
- [9] D'Alessandro, A., & Pergola, G. De. (2015). Mediterranean diet and cardiovascular disease: A critical evaluation of a priori dietary indexes. *Nutrients*, 7(9), 7863–7888. <https://doi.org/10.3390/nu7095367>
- [10] Di Giovacchino, L., Sestili, S., & Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9), 587–601.
- [11] Fito Colomer, M. (2003). Efectos Antioxidantes del Aceite de Oliva y de Sus Compuestos Fenólicos.
- [12] García, J. M., Yousfi, K., Mateos, R. (2001). Reduction of bitterness by heating of olive (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4231–4235.
- [13] Kiritsakis, A. K. (1998a). Flavor components of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 673–681.
- [14] Kiritsakis, A. K. (1998b). Flavor components of olive oil - a review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(6), 673–681.

- [15] Konstantinidou, V., Covas, M.I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., del Carmen Tormos, M., Toledo, E., Marti, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Ruiz Mendez, M.V., Fito, M. (2010). In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB Journal*, 24(7), 2546–2457.
- [16] Kristott, J. (2000). Fats and oils. *Stability and Shelf Life of Food*.
- [17] Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), 647–659.
- [18] Prenzler, P. D., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Robards, K. (2002). Volatile profile of olive oils. *Advances in Horticultural Science*, 16(3–4), 246–252.
- [19] Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., & Simone, N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(4), 228–238.
- [20] Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., & Lucera, L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(2), 57–67.
- [21] Ranalli, A., Tombesi, A., Ferrante, M. L., & De Mattia, G. (1998). Respiratory rate of olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 77(3), 359–367.
- [22] Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M., & Fontanazza, G. (2002). Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 835–839.
- [23] Sacchi, R., Mannina, L., Fiordiponti, P., Barone, P., Paolillo, L., Patumi, M. (1998). Characterization of Italian extra virgin olive oils using H-1-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 3947–3951.
- [24] Sánchez de Medina, V., Riachy, M. El, Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2013). Mass spectrometry to evaluate the effect of the ripening process on phenols of virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(9), 1053–1061. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300059>
- [25] Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography*, 1054(1–2), 113–127.
- [26] Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F.,
- [27] Soler-Rivas C., Epsin J. C., W. H. J. (. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1013–1023.
- [28] Solfrizzi, V., Panza, F., Frisardi, V., Seripa, D., Logroscino, G., Imbimbo, B. P., &
- [29] Tripoli, E., La Guardia, M., Di Majo, D., Giammanco, S., & Giammanco, M. (2009). Composition and Nutritional properties of Mediterranean extra-virgin olive oils. *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale*, 82(1). <https://doi.org/10.4081/4731>
- [30] Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 661–676. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-Doxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. Atherosclerosis](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-Doxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. Atherosclerosis), 117(1), 25–32.
- [31] Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E. D. (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(6), 1402S–1406S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.6.1402S>

---

## Conclusioni finali del Progetto IT4NUEVOO

---

*Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

Il progetto IT4NUEVOO ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione del processo di estrazione al fine di migliorare le rese di estrazione della materia grassa e delle sostanze antiossidanti presenti nelle drupe. La ricerca industriale e lo sviluppo sperimentale del progetto sono stati finalizzati allo sviluppo di un nuovo prodotto alimentare denominato NUEVOO e alla messa a punto di un protocollo di produzione che integri il ciclo produttivo con nuove macchine per migliorare l'estrazione dei composti polifenolici.

Arrivato alla sua conclusione, il Progetto IT4NUEVOO ha consentito di indagare i diversi aspetti che erano stati inizialmente identificati come prioritari ed ha consentito di raggiungere i seguenti importanti obiettivi:

- A) ottimizzazione del processo di estrazione esistente con uno sviluppo tecnologico gestibile e sostenibile;
- B) sviluppo di una nuova tipologia di olio extravergine di oliva con proprietà nutraceutiche e salutari (cioè un contenuto antiossidante potenziato) e un gusto sensoriale molto alto;
- C) sviluppo di uno specifico protocollo di estrazione (EP) che potrebbe diventare il riferimento per la moltitudine di frantoi (OM) micro, piccoli e medi;
- D) rafforzamento dell'immagine dell'EVOO come prodotto salutare e aumento dei consumi;
- E) sviluppo di nuove modifiche/macchine in grado di valorizzare le caratteristiche dell'olio prodotto (nuova gramola, nuovo approccio tecnologico, nuovo sistema di separazione);
- F) sviluppo di un protocollo di trattamento microbiologico dell'olio per aumentarne le caratteristiche nutrizionali;
- G) prime indicazioni sullo sviluppo di nuovi prodotti come salse/condimenti a base di NUEVOO per raggiungere un maggior numero di consumatori.



---

## Conclusions arising from the IT4NUEVOO Project

---

*Giuseppe Altieri, Francesco Genovese, Attilio Matera, Giovanni Carlo Di Renzo*

*Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali (SAFE), Università degli Studi della Basilicata*

The IT4NUEVOO project aimed to optimise the extraction process in order to improve the extraction yields of fat and antioxidant substances present in the olive drupes. The industrial research and experimental development of the project were aimed at the development of a new food product called NUEVOO and the development of a production protocol that integrates the production cycle with new machines to improve the extraction of polyphenolic compounds.

At its conclusion, the IT4NUEVOO Project allowed to investigate the different aspects that had initially been identified as priorities and allowed to achieve the following important objectives:

- A) optimisation of the existing extraction process with manageable and sustainable technological development;
- B) development of a new type of extra virgin olive oil with nutraceutical and healthy properties (i.e. an enhanced antioxidant content) and a very high sensory taste;
- C) development of a specific extraction protocol (EP) that could become the reference for the multitude of micro, small and medium oil mills (OM);
- D) strengthening the image of EVOO as a healthy product and increase of its consumption;
- E) development of new modifications/machines able to enhance the characteristics of the oil produced (new kneading machine, new technological approach, new separation system);
- F) development of a microbiological treatment protocol for the oil to increase its nutritional characteristics;
- G) guidelines on the development of new products such as NUEVOO-based sauces/dressings to reach more consumers.

Finito di impaginare  
nel Novembre 2022

# Il Progetto IT4NUEVOO

Ogni produttore di olio extravergine di oliva (EVOO) è consapevole che la qualità dell'olio prodotto ha un ruolo chiave nella strategia per incoraggiare nuove occasioni di consumo e affrontare le sfide di un mercato globale. Tuttavia, allo stato attuale, in tutti i Paesi produttori è sensibilmente più alta la quantità di olio vergine di oliva (VOO) di scarsa qualità piuttosto che di EVOO. La dimensione aziendale degli oleifici rende molto difficile l'investimento nella ricerca per sviluppare tecnologie, protocolli di estrazione o nuovi prodotti. Dall'altra parte, il consumatore richiede un prodotto di alta qualità con elevate caratteristiche salutistiche e possibilmente nutraceutiche. Per questo motivo diversi studi e progetti sono stati realizzati per sviluppare e verificare come la singola operazione e/o tecnologia di processo influenzano l'estrazione e la qualità dell'olio di oliva. Tuttavia, tutti i risultati sono influenzati da un'elevata variabilità, come molti Autori riportano, a causa di molteplici fattori esterni. Pertanto, il legame intercorrente fra le singole operazioni tecnologiche con la qualità e le proprietà salutari risultano, fino ad ora, non ben definiti a causa di fattori incontrollati. Il progetto IT4NUEVOO ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione del processo di estrazione al fine di migliorare la resa di estrazione e delle sostanze antiossidanti presenti nelle olive. La ricerca industriale e lo sviluppo sperimentale del progetto sono stati finalizzati allo sviluppo di un nuovo prodotto alimentare denominato NUEVOO ed alla messa a punto di un protocollo di produzione che integri il ciclo produttivo con nuove macchine per migliorare l'estrazione dei composti polifenolici.

Every producer of extra virgin olive oil (EVOO) is aware that the quality of the oil produced plays a key role in the strategy aiming to encourage new consumption opportunities and to face the challenges of a global market. However, at present, in all producing countries the amount of poor-quality virgin olive oil (VOO) is significantly higher than EVOO. The company size of the oil mills makes it very difficult to invest in research to develop technologies, extraction protocols or new products. On the other hand, the consumer requires a high-quality product with high health and possibly nutraceutical characteristics. For this reason, several studies and projects have been carried out to develop and verify how the single operation and/or process technology affects the extraction and quality of olive oil. However, all results are influenced by a high variability, as many authors report, due to several external factors. Therefore, the link between the individual technological operations with the quality and health properties is, until now, not well defined due to uncontrolled factors. The IT4NUEVOO project aimed to optimise the extraction process in order to improve the extraction yield and the antioxidant substances present in the oil. The industrial and experimental research of the project were aimed to the development of a new food product called NUEVOO and of a new production protocol integrating the production cycle with new machines in order to improve the polyphenolic compounds extraction.

ISBN: 978-88-31309-18-9

ISBN: 978-88-31309-18-9

